

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas



Título de Tesis:

“Estudio *in silico* de relación estructura-actividad de las endotoxinas bacterianas de tipo Lipopolisacárido y sus derivados con el complejo receptor TLR4/MD-2 y LBP de la respuesta inmune innata asociado al choque séptico”

Tesis presentada como requisito para obtener el título de:

Doctor en Ciencias Químicas

Presenta:

M. en C. Jorge Lozano Aponte

Director:

Dr. Thomas R. F. Scior Jung

Facultad de Ciencias Químicas, BUAP

Asesor:

Dra. Minerva González Melchor

Instituto de Física "Ing. Luis Rivera Terrazas", BUAP

Junio de 2017

Puebla, Puebla, México

Agradecimientos

A la Dra. Laura Orea y a la Dra. Patricia Aguilar quienes fueron apoyo fundamental para poder lograr todo en tiempo y forma, siempre pendientes y dispuestas a apoyar en favor de la conclusión exitosa de este trabajo, mi más humilde agradecimiento por sus ganas de servir. Gracia no sólo por su apoyo administrativo, también por su apoyo académico, moral y personal.

A los Doctores Martín Pérez, Gustavo López, Javier Martínez y Eugenio Sánchez por su apoyo en las revisiones de tesis, siempre mostrando una gran disposición. Sin duda sus aportaciones están plasmadas en este escrito que con su ayuda, hoy está listo y concluido.

A la Dra. Minerva González, a quien no sólo agradezco el apoyo técnico, también el gran apoyo científico al permitirme involucrarme un poco en el área de la Física para comprender las herramientas aplicadas en este trabajo. Muchas gracias por la paciencia y por mostrar siempre su apoyo en todos los sentidos.

Al Dr. Noé Mendoza, quién me apoyó también en la parte técnica y científica. Gracias por su amabilidad y por su ayuda, siempre que tenía alguna duda, el Dr. Noé respondía amablemente y se mantenía al tanto del problema.

Al Dr. Thomas Scior (alias Tom Scior) quien ha sido mi asesor durante casi 10 años desde la licenciatura. Es del él de quien he aprendido prácticamente todo lo que sé de investigación y de quien he adquirido una visión única y diferente de la ciencia. Además, agradezco sus enseñanzas como persona, las cuales son demasiadas, muchas de las cuales son parte de mi vida. Hay en verdad muchas cosas buenas que quisiera y que podría decir o recordar, pero espero que él sabe y conoce cuanto lo aprecio.

Este trabajo de tesis no es únicamente mío, involucra a muchas personas que han aportado algo para su realización, desde comentarios y uno que otro regaño, hasta las correcciones que implican la inversión de tiempo y esfuerzo para generar un trabajo de calidad. A todos aquellos que formaron parte de este proyecto les doy mis más sinceras gracias.

Índice

Abreviaturas	v
Resumen	vi
Abstract	vii
Introducción	1
Antecedentes	4
Lipopolisacárido	4
Activación del complejo receptor TLR4/MD-2 por LPS y sus derivados	6
Estudios de relación estructura-actividad	10
Estudio de acoplamiento molecular ligando-receptor o <i>docking</i>	10
Dinámica molecular	11
Justificación	13
Objetivo General	14
Objetivos particulares	14
Metodología	15
Obtención y generación de los complejos receptores TLR4/MD-2 de las especies a analizar	15
Análisis bioinformático de las secuencias del complejo receptor TLR4/MD-2	17
Modelado por homología del complejo receptor TLR4/MD-2 canino	17
Estudio de acoplamiento molecular ligando-receptor o <i>docking</i>	17
Adecuación de los complejos receptores para dinámica molecular	18
Evaluación de la preferencia posicional de los grupos fosfato dentro del <i>Wedge</i> mediante dinámica molecular	19
Simulaciones iniciales de los grupos fosfato como sonda de evaluación dentro del <i>Wedge</i>	19
Preferencia posicional de los grupos fosfato como sonda de evaluación dentro del <i>Wedge</i>	20
Cálculo de mapas de potenciales de interacción y propiedades electrostáticas del <i>Wedge</i>	20

Resultados y discusión	21
Análisis bioinformático de las secuencias del complejo receptor TLR4/MD-2	21
Modelado por homología del complejo receptor TLR4/MD-2 de la especie canina	24
Estudio de acoplamiento molecular del L4a y el complejo receptor TLR4/MD-2	25
Evaluación de la preferencia posicional de los grupos fosfato dentro del <i>Wedge</i> mediante dinámica molecular	26
Simulaciones iniciales de los grupos fosfato como sonda de evaluación dentro del <i>Wedge</i>	27
Preferencia posicional de los grupos fosfato como sonda de evaluación dentro del <i>Wedge</i>	31
Mapas de potencial de interacción de los grupos fosfato dentro del <i>Wedge</i>	42
Análisis de las propiedades electrostáticas del <i>Wedge</i>	46
Adecuaciones al <i>Wedge</i> reportado	51
Acoplamiento molecular automático del lípido A con la proteína de unión a Lipopolisacárido	52
Acoplamiento molecular restringido del lípido A con la proteína de unión a Lipopolisacárido	54
Conclusiones	55
Referencias	56
Apéndice	58
A1. Evaluación de las cargas del grupo fosfato en un sistema bifásico ciclohexano/agua (Metodología)	58
A2. Evaluación de la difusión del grupo fosfato en un sistema acuoso (Metodología)	58
A3. Evaluación de las cargas del grupo fosfato en un sistema bifásico ciclohexano/agua	59

A4. Evaluación de la difusión del grupo fosfato en un sistema acuoso	60
A5. Cargas parciales de la sonda fosfato y residuos aminoacídicos de <i>Wedge</i>	62
A6. Distancias de interacción de grupos fosfato con residuos del <i>Wedge</i> (pruebas iniciales concluidas)	63
A7. Preferencia posicional de los grupos fosfato como sonda de evaluación dentro del <i>Wedge</i> . Gráficos de distancia de interacción en función del tiempo para cada especie	67
A8. Dinámica molecular con el TLR4 contrario (TLR4*).	82
A9. Análisis del estado de ionización de los residuos del <i>Wedge</i> por dinámica molecular	83
Referencias (Apéndice)	85
Índice de Figuras	86
Índice de Tablas	88

Abreviaturas

Ag	Agonista.
An	Antagonista.
IFN γ	Interferón gamma.
IL-1 β	Interleucina 1-beta.
L4a	Lípido IVa.
LA	Lípido A.
LBP	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i> (proteína de unión a LPS).
LPS	Lipopolisacárido.
MD	<i>Molecular dynamics</i> (dinámica molecular).
MD-2	<i>Mieloid differentiation factor 2</i> (factor mieloide de diferenciación 2).
MD-2*	Subunidad MD-2 que pertenece al TLR4* (o TLR4 contrario).
MSA	<i>Multiple sequence alignment</i> (Alineamiento múltiple de secuencias).
Pag	Sitio del grupo fosfato en posición agonista dentro del <i>Wedge</i> para el LPS y derivados.
Pan	Sitio del grupo fosfato en posición antagonista dentro del <i>Wedge</i> para el LPS y derivados.
PagPan	Sitio del grupo fosfato en posición agonista/antagonista dentro del <i>Wedge</i> para el LPS y derivados.
[shortTLR4*/TLR4/MD-2]	Adecuación del complejo receptor TLR4/MD-2 dimérico que contiene únicamente un <i>Wedge</i> . También denotado por Δ .
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i> .
TLR4*	TLR4 contrario. Subunidad proteica que interactúa con otro complejo monomérico para formar un dímero.
[TLR4/MD-2]	Complejo receptor TLR4/MD-2 monomérico (>).
[TLR4/MD-2] ₂	Complejo receptor TLR4/MD-2 dimérico (Δ). También denotado como: [TLR4/MD-2][TLR4/MD-2] o [TLR4*/MD-2*/TLR4/MD-2].
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α .
VdW	<i>Van der Waals</i> .
<i>Wedge</i>	Interfaz de interacción triangular y que se presenta entre las subunidades TLR4*, TLR4 y MD-2 en su forma dimérica.

Resumen

El choque séptico es un problema de salud de incidencia desconocida en México. Representa un problema de salud con fuertes implicaciones sociales, laborales y económicas. La sepsis es una complicación clínica poco frecuente, pero, una vez que se manifiesta, tiene un pronóstico desfavorable con una elevada probabilidad de ser mortal.

El objeto de este trabajo de investigación, es el estudio de las interacciones de Lipopolisacárido (LPS) con el complejo receptor TLR4/MD-2. Particularmente, se estudia la interacción de los grupos fosfato del LPS y sus derivados, así como las propiedades electrostáticas del sitio de unión por medio de métodos computacionales. El conocimiento derivado de este estudio contribuye al conocimiento del reconocimiento de ligandos de tipo LPS por el complejo de receptores TLR4/MD-2. Elucidar el mecanismo molecular de acción de este tipo de ligandos es fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos que ayuden en el tratamiento del choque séptico, pues actualmente no existe una terapia dirigida.

Se ha realizado el estudio de acoplamiento entre el lípido IVa (L4a), un precursor del LPS que presenta actividad dual especie-específica, y el complejo receptor TLR4/MD-2 en una interfaz de interacción triangular o en forma de cuña dentro del complejo receptor, denominado Wedge. Dentro del Wedge se han mapeado los residuos aminoacídicos que participan en la interacción con los grupos fosfato del L4a en tres especies de mamíferos (humano, ratón y caballo), lo que constituye la primera y principal aportación de este trabajo a la ciencia. Por medio de dinámica molecular, se ha evaluado de forma sistemática la preferencia posicional de los grupos fosfato como sonda dentro del Wedge en busca de un comportamiento dependiente de la especie. Los grupos fosfato son conocidos como grupos funcionales implicados en la activación (o inhibición) del receptor mediada por derivados del LPS. Por esta razón, constituyen una sonda adecuada para explorar el Wedge en busca de interacciones electrostáticas que activen (o bloqueen) al receptor de forma especie-específica como lo hace el L4a. Además, se ha simulado el potencial de interacción del grupo fosfato por medio de mapas proyectados sobre la superficie del Wedge. Estos mapas de potencial de interacción fueron proyectados sobre las propiedades electrostáticas del Wedge.

Con la finalidad de elucidar el mecanismo molecular de acción de los ligandos en interacción con sus receptores se realizó el estudio de acoplamiento entre el lípido A y la proteína de unión a LPS (LBP: Lipopolysaccharide binding protein). La estructura de la LBP murina fue resuelta mediante rayos-X sin estar unida al LPS o al lípido A (LA), su parte activa, además de que el sitio de unión propuesto para LPS no ha sido comprobado plenamente.

El análisis de los resultados analizados sobre la preferencia posicional de los grupos fosfato por dinámica molecular, mapas de potencial de interacción de los grupos fosfato y propiedades electrostáticas del Wedge, arrojan que la suposición de un comportamiento dependiente de la especie de los grupos fosfato es incorrecta. Los grupos fosfato manifiestan un comportamiento que está más determinado por el azar que por la especie, lo cual fue corroborado mediante el análisis de cargas del Wedge. El comportamiento dependiente de la especie está influenciado por otros factores hasta ahora desconocidos y no contemplados en este trabajo. El reconocimiento de ligandos de tipo LPS por sus complejos receptores podría estar relacionado con el grado de acilación de este tipo de ligandos y puede ser un aspecto a estudiar a futuro.

El análisis de la preferencia posicional de los grupos fosfato mediante dinámica molecular permitió realizar adecuaciones al modelo del Wedge presentado con anterioridad. Se presenta por primera vez el Wedge de la especie canina, que presenta similitudes con los de las especies humana y equina.

Se identificaron posible sitios de unión al LPS en la LBP por medio del estudio de acoplamiento que corresponden a lugares descritos experimentalmente en la literatura. Uno de los tres sitios forma una cavidad para la unión del LA en una depresión sobre la superficie de la LBP completa que no corresponde al sitio de unión propuesto por los propios autores de la estructura cristalográfica de la LBP. En un segundo acercamiento, se restringió el estudio de acoplamiento al sitio de unión propuesto por los autores, reportándose tres posibles modos de interacción del LA con la LBP.

Abstract

Septic shock is a health problem of unknown and underestimated incidence in Mexico. Despite this, it is a prevalent health problem with severe social, occupational and economic implications. Fortunately, sepsis is a rare clinical complication for patients. But, once developed, it shows an extremely unfavorable prognostic aspect with mortal outcome of highest probability.

The purpose of this research work is the study of the electrostatic interaction between Lipopolysaccharide (LPS) and the TLR4/MD-2 receptor complex. In particular, the phosphate group interactions of LPS and derivatives, and the binding site electrostatic properties are studied by computational means. The knowledge derived from this work, can contribute to the understanding of LPS-like molecules by the TLR4/MD-2 receptor complex. Elucidating the action mechanism of this kind of ligands is fundamental to develop new drugs for sepsis treatment, because actually there is not a specific therapy.

Docking study was carried out between lipid IVa (L4a), a LPS precursor that shows species-specific dual activity, and the TLR4/MD-2 receptor complex in a triangular interaction interface inside the receptor complex named Wedge. This triangular interface or Wedge, is the principal contribution of this work to science. Its residues with the interacting LPS phosphates groups have been mapped. By molecular dynamics simulations, the positional preference of the phosphate groups as probes, have been evaluated in a systematic way to find species dependent effects. Phosphate groups have been reported as functional groups implicated in the receptor activation (or inhibition) mediated by this type of molecules. For this reason, they constitute an adequate probe to explore the Wedge and search for electrostatic interactions with the receptor activation (or inhibition) in a species-specific way. Furthermore, the interaction potential have been simulated with maps projected upon the Wedge surface. The Wedge electrostatic properties were overlaid by these maps.

In the context of the LPS-like ligands in interactions with its receptors, a docking study between LA and Lipopolysaccharide binding protein (LBP) have been accomplished. The literature reports a LBP structure that was solved by X-ray but it doesn't shows LPS, or its active precursor. The LPS binding site of LBP has not been establish so far.

Results about the phosphate positional preferences by molecular dynamics simulations, phosphate groups interaction potential maps and the Wedge electrostatic properties analysis, show that the species-specificity assumption for the phosphate groups is not correct. It showed a random-determined behavior, no related with the amino acid sequence species, supported by a net charge analysis of the Wedge. The species-dependent effects of LPS-like molecules is due to other unknown factors not considered in this work, probably bulk steric effects. The acylation state of LPS-like ligands could be an aspect to consider in the future.

The phosphate positional preferences study by molecular dynamics allowed to make adjustments to the Wedge model previously reported in this work, too. In this work, the canine Wedge is presented for the first time.

By docking study, different possible binding sites for LPS were identified. This sites correspond with experimental sites describes in literature. One of the sites forms a cavity for LA binding in a depression in the LBP surface that is no related to the binding site proposed by the authors of the LBP crystallographic structure. In another approach, the docking study was restricted to the proposed binding site and three different possible binding modes for LA with LBP are proposed.

Introducción

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra patógenos exógenos. La activación de dicha respuesta produce citocinas proinflamatorias tales como IL-1 β y TNF- α , las cuales ayudan a prevenir la infección y son potenciadores de la respuesta inmune adaptativa [1]. El efecto de estas citocinas puede ser perjudicial cuando son producidas en abundancia, derivando en lo que se conoce como sepsis o choque séptico. El choque séptico por bacterias Gram-negativas presenta una alta mortalidad, alrededor del 20% en unidades de cuidados intensivos en los Estados Unidos, y prolongadas estancias hospitalarias con altos costos de atención [2]. En México, los datos epidemiológicos de esta enfermedad son desconocidos por las instituciones de salud pública. Sin embargo, un estudio de 2009 que incluyó 135 unidades de terapia intensiva de hospitales públicos y privados en 24 estados de la República, encontró que cada día se reportaron 30 nuevos casos de sepsis, de los cuales 9 murieron, cifras que probablemente serían mayores si se considerara todo el sistema de salud mexicano [3].

En las bacterias Gram-negativas, el **Lipopolisacárido (LPS)**, también conocido como “endotoxina”, constituye el mayor componente de la membrana externa. El LPS activa la respuesta inmune innata a través del receptor *Toll-like 4 (TLR4)* y el Factor Mieloide de Diferenciación 2 (**MD-2: Mieloid differentiation factor 2**). El componente activo del LPS es el **lípidio A (LA)**, un glicolípido parcialmente conservado que ancla al LPS a la lámina superficial de la membrana externa bacteriana. Los principales blancos celulares del LPS, en mamíferos, son los monocitos periféricos, macrófagos de los tejidos y neutrófilos, los cuales expresan constitutivamente los receptores CD14 y TLR4. Las células mononucleares humanas reaccionan con extrema sensibilidad al LPS endotóxico (agonista) presentando un valor umbral, *in vitro* o en cultivos celulares con suero, de aproximadamente 1-10 pg/ml. Esta hipersensibilización al LPS provoca la producción de Interferón- γ (IFN- γ) el cual aumenta la sensibilidad, magnitud y mantenimiento de la respuesta monocítica al LPS *in vitro* [2,4].

La activación *in vitro* de células mononucleares por formas endotóxicas de LPS o LA, lleva a la secreción de una amplia gama de mediadores endógenos como, Factores estimuladores de colonias (CSFs), Factor activador de plaquetas (PAF), Prostaglandina E₂ (PGE₂), tromboxano A₂, leucotrienos, especies reactivas de oxígeno, radicales hidroxilo y óxido nítrico, citocinas como

TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 e IL-18. En particular, las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 pueden iniciar una compleja red de reacciones secundarias, entre ellas la estimulación de la fase aguda de secreción de proteínas por hepatocitos en el hígado, la activación de linfocitos, trombocitos, basófilos y eosinófilos, además de una elevada actividad hematopoyética en la médula y un estado procoagulador sistémico incrementado [1,4,5,6].

Se ha señalado a la familia de receptores *Toll-like* (TLR) como responsable de encender la cascada de señalización de diversos tipos de células de mamíferos, incluyendo fagocitos, al ser activados dichos receptores por el LPS. Aunque el TLR4 es comúnmente referido como el receptor del LPS, este no se une directamente al LPS u otro análogo. El LPS se une directamente a la cavidad hidrofóbica central del co-receptor MD-2, una proteína que se asocia físicamente con el TLR4 [1,2,4,5,7,8].

El presente estudio está enfocado en el análisis *in silico* de las interacciones del Lipopolisacárido, sus derivados y/o sus componentes químicos con sus dianas biomoleculares (**Figura 1**, recuadro rojo), así como el análisis de la relación estructura-actividad, ya que este tipo de ligandos no presentan el clásico patrón de actividad biológica de “estructura semejante, efecto semejante”. El entendimiento bioquímico de estos aspectos a nivel molecular, podría ayudar al desarrollo de antídotos contra la sepsis o el choque séptico, ya que actualmente no existe una farmacoterapia específica contra esta enfermedad.

El objetivo principal de este proyecto no es el diseño de un nuevo fármaco o antídoto contra la sepsis, sino sentar las bases de la interacción ligando-receptor que puedan proporcionar información, a nivel molecular, que permita el desarrollo de nuevas propuestas moleculares contra la sepsis.

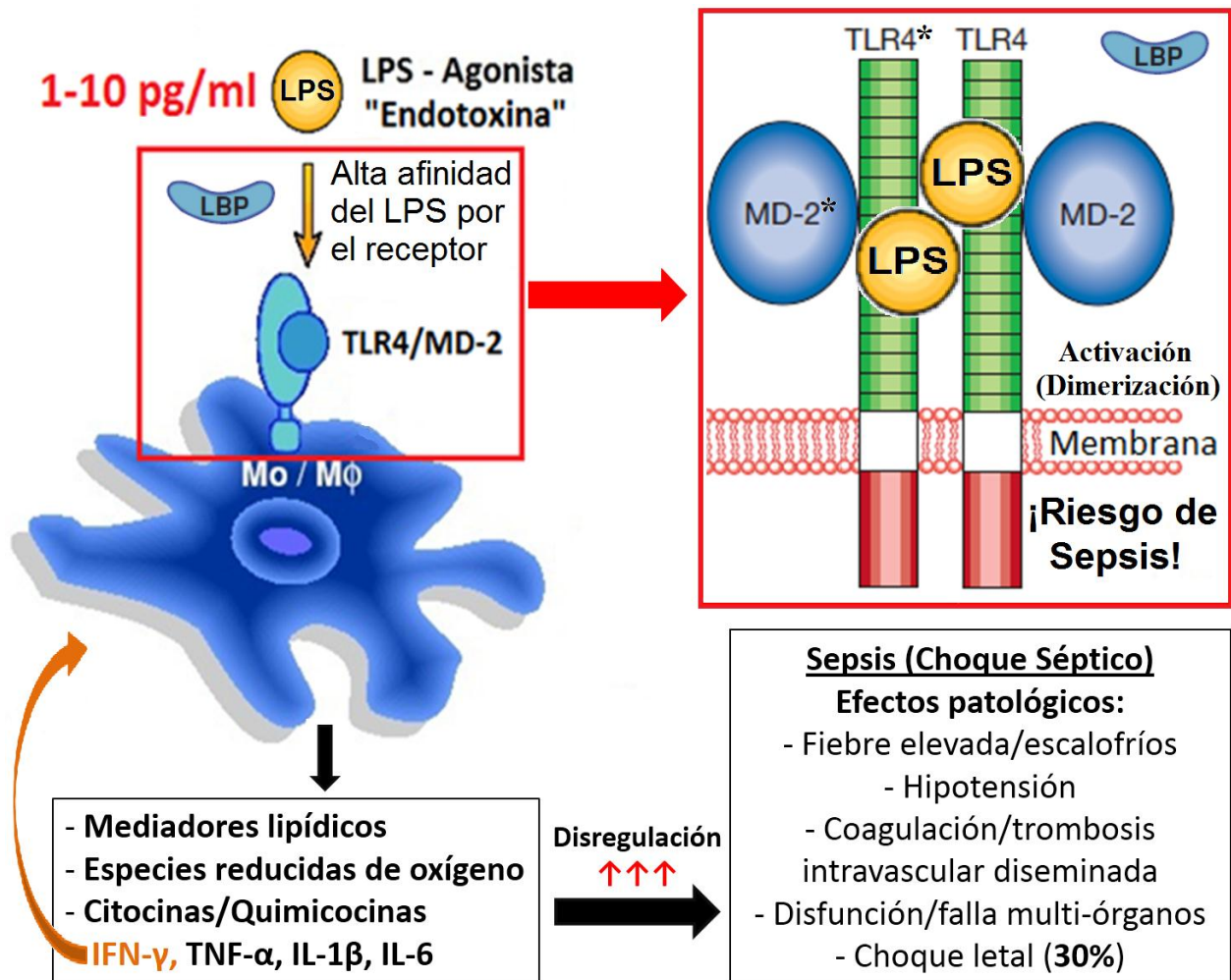


Figura 1. Activación de la Respuesta inmune innata mediada por LPS en Macrófagos (Mo/Mφ). De acuerdo al modelo aceptado, la proteína de unión a LPS (LBP: *LPS-binding protein*) cataliza la transferencia del LPS hacia el receptor de membrana TLR4/MD-2 activándolo. En los recuadros rojos, se señalan las dianas moleculares objeto de este estudio, el del lado derecho representa al complejo receptor TLR4/MD-2 en su forma activa (dimerizado).

Antecedentes

Lipopolisacárido

El término **Lipopolisacárido (LPS)** comprende una familia de compuestos de carácter anfifílico, con una región predominante de carácter lipofílico, **lípidio A (LA)**, unida covalentemente a una porción hidrofílica de oligosacáridos. El LPS es un componente esencial de la membrana externa en varios tipos de bacterias Gram-negativas. Algunas de estas bacterias patógenas para el ser humano incluyen a *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Chlamydia trachomatis*. La membrana externa de *E. coli* es asimétrica, su porción lipídica de la lámina superficial está formada principalmente de regiones de LA del LPS y cubren cerca del 75% del total de la superficie. La lámina interior de dicha membrana está compuesta principalmente de fosfolípidos y cadenas acilo de lipoproteínas bacterianas insertadas (**Figura 2**) [2,4,5].

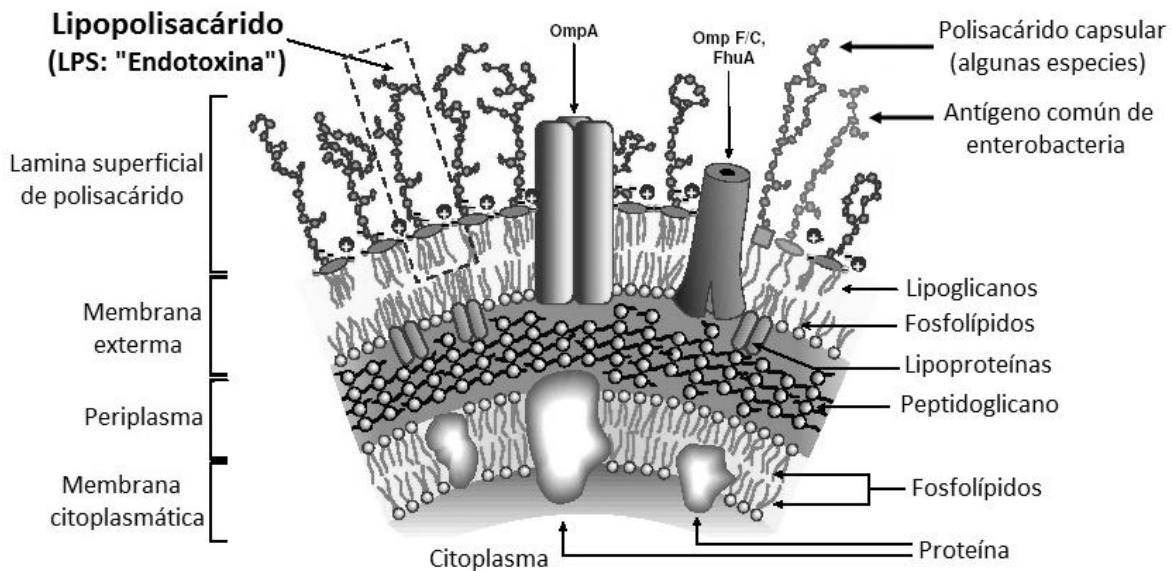


Figura 2. Arquitectura de la pared celular de bacterias Gram-negativas. Se observa la presencia de dos bicapas lipídicas (interna o citoplasmática y externa), separadas por el periplasma que contiene redes de peptidoglicano o mureína. La capa superficial de la membrana externa presenta una construcción asimétrica, cubierta principalmente por LPS. OmpA y OmpC/F: *Outer membrane proteins like porins*, FhuA: *Ferric hydroximate uptake receptor*. Modificado de [4].

El LPS es uno de los más potentes inmunoestimuladores ya que actúa a concentraciones picomolares, por lo cual, es un indicador de infección por bacterias Gram-negativas. En general, el LA es el centro con actividad inmunoreactiva [2,4,5,8] y su base estructural consiste de un esqueleto di-glucosamino-di-fosfato, con una estructura compuesta por seis cadenas acilo alifáticas que lo anclan a la membrana. Unido a un núcleo oligosacárido, el LPS típicamente contiene una cadena variable de azúcares llamada antígeno-O ó cadena-O. Al remover el núcleo oligosacárido y la cadena-O, se produce el LA, el cual es capaz de inducir endotoxicidad, con algunas excepciones (**Figura 3**) [4,8,9].

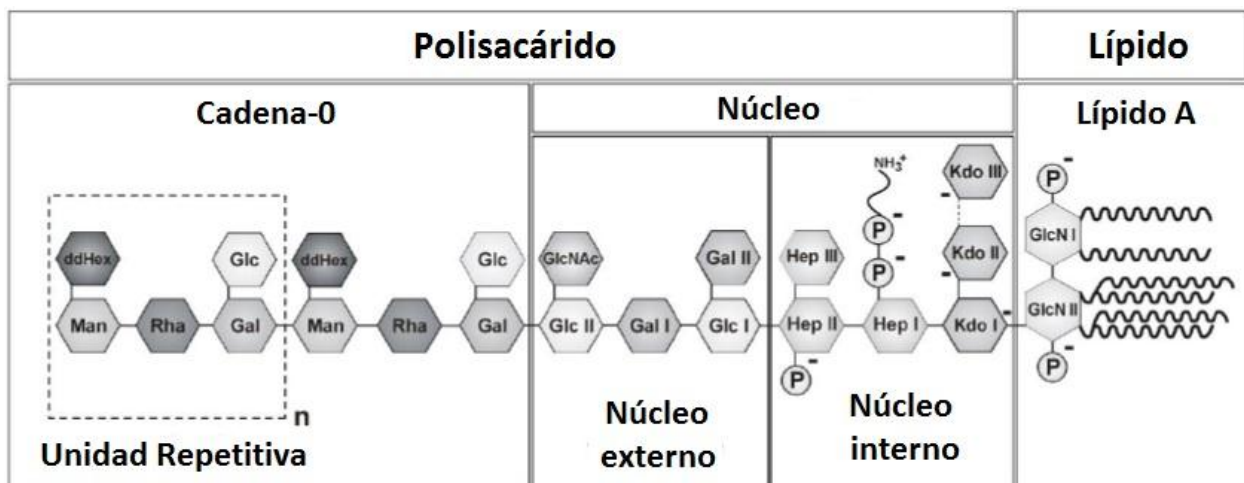


Figura 3. Estructura química general del LPS de bacterias Gram-negativas. Todas las formas de LPS conocidas contienen Lípido A que lo ancla a la membrana unido covalentemente a una porción oligosacárida, la cual está compuesta de la región central y la cadena-O específica formada por más de 50 unidades repetitivas (recuadro punteado). El núcleo interno y externo se distinguen por su composición de azúcares característica. GlcN: glucosamina, Kdo: Ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico, Hep: D-glicero-D-mano-heptosa. Modificado de [8].

La forma prototípica y dominante de LA de *E. coli*, consiste de un esqueleto de dos glucosaminas monofosforiladas unidas por un enlace $\beta(1-6)$, designadas como GlcN I y GlcN II, y una región hidrofóbica compuesta por seis cadenas (hidroxil-) acilo de 12 y 14 átomos de carbono. A mayor detalle, en esta estructura hexa-acilada, un subgrupo de 4 residuos 3-hidroximiristoil (3-OH-C_{14}) está unido directamente al esqueleto $\beta\text{-D-glucosaminil-(1,6)-}\beta\text{-D-glucosamino}$ por dos enlaces amido y dos éster en posiciones 2/2' and 3/3', respectivamente, y los grupos 3-OH de los residuos primarios en posiciones 2' y 3' en GlcN II se encuentran totalmente esterificados con grupos lauril (C_{12}) y miristoil (C_{14}), respectivamente. Los dos grupos fosfato del esqueleto del LA

difieren químicamente, mientras que uno está unido por enlace α -glucosídico al monómero reductor (GlcN I) en posición 1, el otro está unido por un enlace éster en la posición 4' de la unidad GlcN II (**Figura 4**) [2].

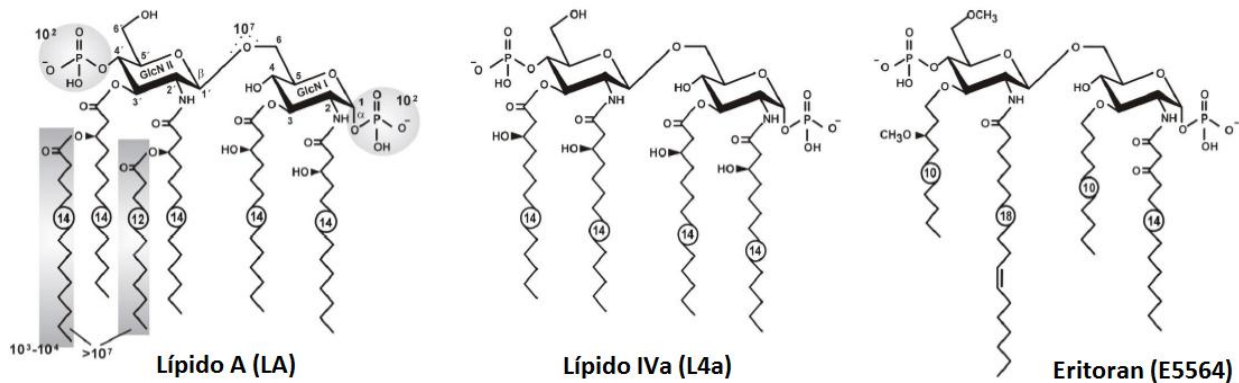


Figura 4. Estructura molecular del LA del LPS, su precursor L4a, y del inhibidor Eritoran (E5564). Los valores numéricos en el LA, son aproximaciones que describen una reducción en la activación de monocitos humanos debido a la omisión/supresión de los elementos estructurales indicados. Modificado de [2] y [8].

La presencia de ambos grupos fosfato (P1: 1α -GlcN I y P2: 4'-GlcN II) contribuye a la dimerización del complejo TL4/MD-2/LPS. El LPS de *Capnocytophaga canimorsus* es cien veces menos endotóxico en comparación con *E. coli*, ya que tiene una estructura di-glucosamino-mono-fosfato penta-acilado y carece del grupo fosfato en posición 4' del GlcN II que presenta el LA de *E. coli* [8].

Singularmente, el **lípidio IVa (L4a, Figura 4)**, precursor del LA y antagonista en células humanas, se comporta como agonista en estudios realizados con células de ratón [2,10-12]. En este estudio, la naturaleza ambivalente (agonista/antagonista) del LPS ha sido plenamente confirmada. Muchos estudios, con resultados contradictorios, han tratado de comprender los aspectos moleculares de esta especificidad dependiente de la especie, ya que mientras unos señalan que la especificidad del L4a es debida al TLR4, otros señalan que el MD-2 es el responsable de la respuesta especie-especifica del L4a [2,10].

Activación del complejo receptor TLR4/MD-2 por LPS y sus derivados

El sistema inmune innato de mamíferos reconoce a las bacterias y a los componentes de su pared celular a través de dos tipos de receptores, los CD14 y la familia de receptores *Toll-like*. Sin embargo, el TLR4 por sí solo no es capaz de unirse al LPS. Para ello, el TLR4 requiere de una

proteína que le asiste, el co-receptor MD-2. Dicha proteína, de 25 kDa y de 160 aminoácidos, está asociada al TLR4 en la superficie celular (**Figura 5**, izquierda) y permite la respuesta al LPS [11]. Se ha reportado además, que las proteínas CD14 y la proteína de unión a LPS (LBP: *LPS-binding protein*) aumentan la respuesta al LPS, actuando como proteínas transportadoras [9]. El LA del LPS interactúa con la larga cavidad hidrofóbica del MD-2. Su esqueleto diglucosamino está fosforilado por ambos lados. La posición adoptada por el LA permite a los dos fosfatos participar en la formación de puentes salinos con cadenas laterales con carga positiva en ambas subunidades de TLR4, lo que contribuye a la dimerización. Las interacciones específicas entre el LA y el complejo TLR4/MD-2 con el LPS, inducen un rearrreglo y dimerización en un complejo de forma de “m” de dos unidades TLR4/MD-2/LPS ($[\text{TLR4/MD-2/LPS}]_2$, **Figura 5**).

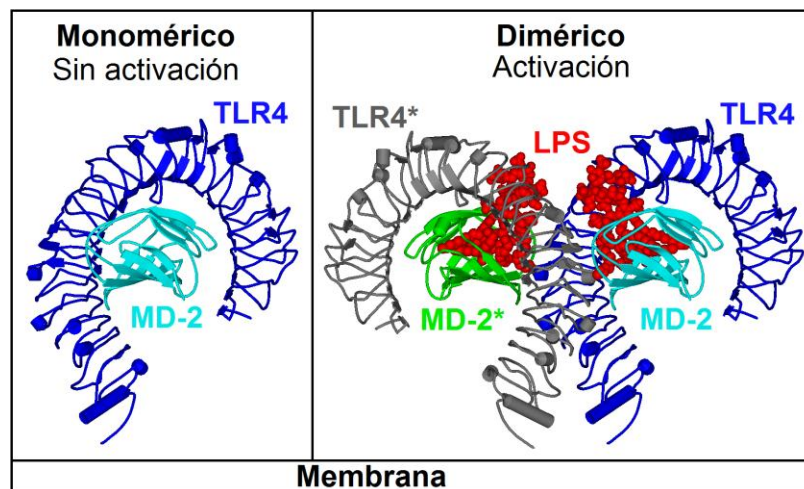


Figura 5. Representación 3D del complejo monomérico no activado [TLR4/MD-2] (izquierda) y dimérico activado $[\text{TLR4/MD-2/LPS}]_2$ en forma de “m” (derecha). El LPS se une a la cavidad hidrofóbica del MD-2 interactuando con ambas unidades de TLR4.

Esta formación dimérica en la superficie celular, constituye un paso clave para la activación de la respuesta inmune innata en mamíferos [8,13,14]. Cuando el LPS se une al complejo, está dentro del homodímero con forma de “m” simétrica de dos complejos; expresados como $[\text{TLR4/MD-2/LPS}]_2$, mientras que el antagonista Eritoran o el L4a cristalizan en complejos monoméricos $[\text{TLR4/MD-2/Eritoran}]$ o $[\text{MD-2/L4a}]$, respectivamente. Tanto el MD-2 humano (hMD-2) como el hTLR4 requieren cambios conformacionales inducidos que permiten la dimerización [2,12,14]. La subestructura base de los agonistas se encuentran en una orientación con la unidad glucosamina-I-fosfato (1α) de cara hacia el sitio de dimerización (señalización), mientras que los

antagonistas presentan un giro horizontal de 180° respecto a la estructura del LPS, y se encuentran más profundamente unidos, los grupos acilo y amido están ocultos dentro de la cavidad del MD-2, el grupo fosfato no interactúa con el TLR4 posterior y la dimerización no ocurre (**Figura 6**) [8].

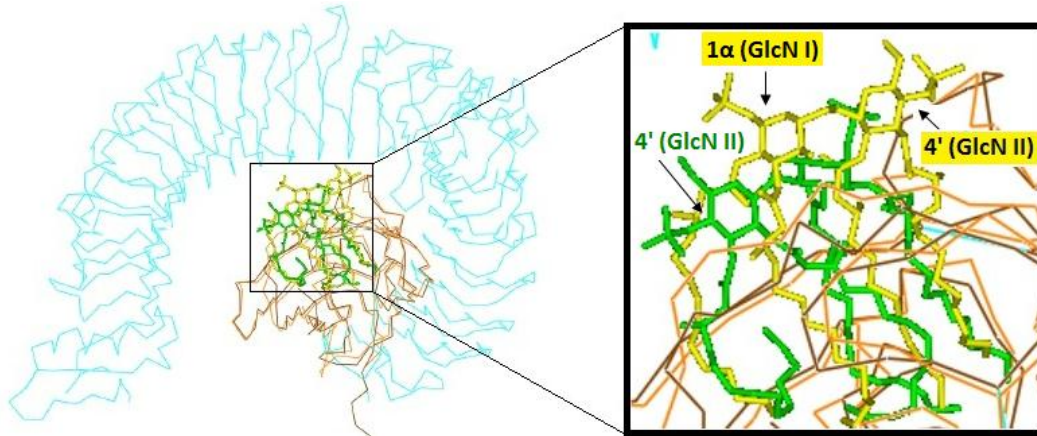


Figura 6. Representación 3D de las conformaciones agonista (ratón; amarillo) y antagonista (humano; verde) del L4a. Como antagonista, el carbono 4', está en posición contraria (presentando un giro de 180°) en relación a la forma agonista, y se une más profundamente en la cavidad del MD-2 (ratón; naranja y humano; café). Se presenta únicamente el TLR4 murino en color azul, pues el L4a es antagonista en humano (no es dímero). Modificado de [8].

Existen diferencias dependientes de la especie, ya que mientras el LA hexa-acilado es agonista en humano, ratón y caballo, el L4a tetra-acilado lo es en ratón y caballo. En contraste el L4a es antagonista en humanos, y el Eritoran lo es en humano, ratón y caballo. El LPS de *E. coli* es el más potente. Resulta claro que el L4a actúa como agonista o antagonista de una manera especie-dependiente. Evidentemente, no hay una “clásica” correspondencia en la relación estructura-actividad del L4a, que puede ser visto más como un agonista imperfecto que como un compuesto con actividad dual, pues puede unirse de manera especie-dependiente en una orientación agonista (con una superficie más expuesta de su esqueleto, como en el complejo cristalizado de ratón) o en su orientación antagonista con el esqueleto di-glucosimino-di-fosforilado invertido como lo revela el complejo humano MD-2/L4a en la **Figura 6** [2,8,12].

Con la finalidad de esclarecer porque ciertos derivados del LPS, tal como el L4a, presentan un doble perfil de actividad biológica, se ha establecido un modelo de interacción de esta clase de moléculas con el complejo receptor TLR4/MD-2 para las diferentes especies a analizar. De acuerdo a lo reportado, estas interacciones están representadas en forma de “cuña” (*Wedge*) que

facilitan su visualización e interpretación [8]. Como se mencionó, para darse la activación de la respuesta inmune es necesario la dimerización del complejo [TLR4/MD-2/LPS], por lo que el LPS (o derivados en orientación agonista) no sólo debe de interactuar con ambos co-receptores, sino debe de formar adicionalmente interacciones con un TLR4 contrario (denominado TLR4*, **Figura 7**).

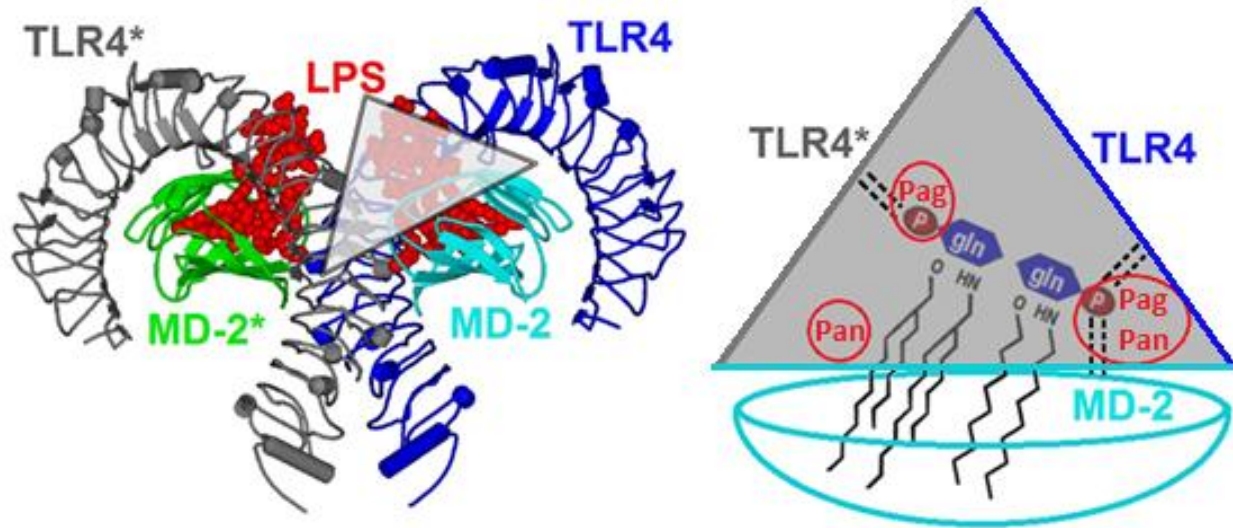


Figura 7. Modelo de interacción en forma de cuña o *Wedge*, (derecha) propuesto para el LPS y sus derivados [8]. Como agonistas, el LPS o sus derivados forman interacciones (denotadas por las líneas punteadas) con los tres componentes de la interfaz en forma de cuña. Como antagonistas, uno de los grupos fosfato se coloca en la posición Pan (parte inferior izquierda de la cuña o *Wedge*), sin interactuar con el TLR4* y no hay dimerización. Los colores en cada lado de la cuña hacen referencia a una entidad proteica del lado izquierdo de la imagen, como se puede ver, el MD-2* (MD-2 del TLR4 contrario o TLR4*), no participa en la interfaz de interacción representada. TLR4*: TLR4 contrario, Pag: fosfato en posición agonista, Pan: fosfato en posición antagonista.

En el modelo del *Wedge* (**Figura 7**), se observan tres sitios donde se colocan los grupos fosfato de moléculas tipo LPS, denominados como PagPan (fosfato en posición agonista/antagonista), Pag (fosfato en posición agonista) y Pan (fosfato en posición antagonista). Para el LPS o derivados con efecto agonista, el fosfato 2 (P2, del GlcN II) se coloca en el sitio PagPan y el fosfato 1 (P1, del GlcN I) se coloca en el sitio Pag, donde forma interacciones con el TLR4* activando al complejo receptor. Los ligandos con efecto antagonista colocan el P1 en el sitio PagPan y el P2 en el sitio Pan sin interactuar con el TLR4*, por lo que no hay activación. Al poseer dos grupos fosfato, el LPS y derivados tanto agonistas como antagonistas, pueden colocar uno de estos en la posición PagPan.

Estudios de relación estructura-actividad

El análisis SAR (*Structure-Activity Relationships*) permite, para un conjunto de compuestos similares, relacionar de forma cualitativa aquellos grupos funcionales con actividades biológicas. Adicionalmente, permite encontrar aquellas características moleculares que afectan su actividad biológica y cuáles pueden ser modificables para mejora de la misma. Por lo tanto, para una serie de moléculas biológicamente activas, cualquier variación sistemática en su estructura química, se espera sea reflejada en una variación de la respuesta biológica (**Figura 9**) [15-18].

Estudio de acoplamiento molecular ligando-receptor o *docking*

El término *in silico* se refiere al empleo de métodos o simulaciones computacionales como herramientas de estudio [15,16]. En este sentido, el estudio computacional de acoplamiento molecular o *docking* tiene por objeto el análisis de la interacción entre un ligando (fármacos, fitofármacos, tóxicos, etc.) y un receptor o blanco biomolecular presente en un organismo vivo, tal como proteínas, enzimas o canales iónicos, de las cuales se conoce su estructura tridimensional. El tipo de análisis es básicamente un método teórico, no llevado a cabo *in vitro* o *in vivo*, el cual permite identificar la conformación, posición y orientación óptimas que adopta un ligando al interactuar con su receptor dentro del sitio activo [19].

En principio, existen dos tipos de interacciones moleculares entre ligando y sitio de unión:

- (1) Contactos estéricos entre átomos (núcleos), p. ej, impedimento estérico, repulsiones de radios de *Van der Waals* (VdW), puentes salinos:
- (2) Contactos electrónicos entre cargas totales y parciales, p. ej, repulsión y atracción electrostática (incluidas las fuerzas de VdW), interacciones hidrofóbicas, π - π *stacking*.

A partir de su combinación se pueden dar la formación de puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, fuerzas de VdW por mencionar algunas interacciones no-covalentes. Dichos fenómenos son imitados por parte del algoritmo del programa de acoplamiento (*docking function*). En el caso de *Autodock* se dan las siguientes contribuciones matemáticamente descritas:

$$\Delta G = \Delta G_{vdW} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} + \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \Delta G_{Hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} + \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \\ + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + \Delta G_{tor} N_{tor} + \Delta G_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2)}$$

Donde los términos ΔG del lado derecho de la ecuación, son coeficientes determinados empíricamente usando regresión lineal a partir de un conjunto de complejos ligando-receptor con constantes de afinidad conocidas. Las sumatorias se llevan a cabo sobre todos los pares de los átomos de los ligandos, i , y de los átomos del receptor, j [20].

En función de lo anterior, el estudio de acoplamiento ofrece una predicción de la afinidad ligando-receptor en términos de la energía libre de interacción o $\Delta G_{\text{interacción}}$ en un ranking de potenciales soluciones (*scoring function*) [19,20].

Dinámica molecular

Una de las principales herramientas en el estudio teórico de moléculas biológicas es el método de simulación por Dinámica Molecular (MD: *Molecular Dynamics*). Este método de simulación *in silico* permite el estudio del comportamiento de un sistema molecular en función del tiempo y es usado rutinariamente para la investigación de diversas estructuras químicas, incluyendo el análisis de la interacción ligando-receptor [21]. Las simulaciones por MD pueden ser tratadas como un experimento como se muestra en la **Figura 8**.

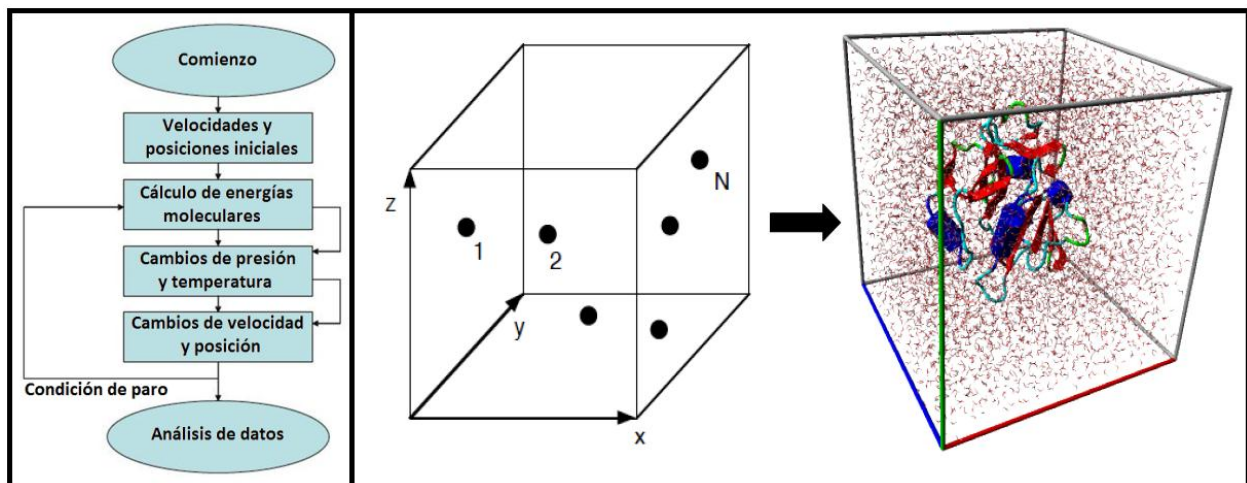


Figura 8. Simulaciones por dinámica molecular. Del lado izquierdo se observa el esquema general de una dinámica molecular, donde la condición de paro generalmente esta en función del tiempo de simulación. En dinámica molecular, la proteína a estudiar se coloca dentro de un espacio delimitado llamado “celda de simulación” (lado derecho). El número de átomos (N) esta determinado por aquellos que constituyen a la proteína y el número de moléculas de agua presentes. La presencia del agua permite una mejor representatividad al tratarse de un sistema biológico como se observa al lado derecho de la flecha.

De manera sencilla, MD puede ser definido como un método de “rastreo de partículas”, pues es un método para la generación de trayectorias de un sistema de N partículas que interactúan entre sí. A partir de las posiciones y velocidades atómicas en un tiempo inicial, se obtienen las posiciones y velocidades en tiempos posteriores por integración numérica directa de las ecuaciones del movimiento de Newton ($m_i d^2\mathbf{r}_i/dt^2 = \mathbf{F}_i$, $\mathbf{F}_i = -\nabla_{\mathbf{r}_i}U$, $E = K + U$; m_i , \mathbf{r}_i , y \mathbf{F}_i : son la masa, la posición y la fuerza del átomo i , respectivamente; E : Energía interna; K : Energía cinética; U : Energía potencial), con especificaciones de un potencial interatómico (campo de fuerza o *force field*), y condiciones termodinámicas específicas como temperatura o presión [22,23]. Para un sistema con N átomos, se dan las condiciones a las que se desea la simulación. En una primera etapa se permite que el sistema evolucione hacia el equilibrio (a la temperatura y/o presión impuestas) y en una segunda etapa se ejecuta el cálculo de interés durante un número finito de ciclos de simulación, de donde se obtienen las propiedades promedio [24].

Se han realizado, con resultados inconclusos, diversos intentos por comprender aquellos aspectos moleculares involucrados en la actividad del LPS y sus derivados. La comprensión de la interacción del LPS y el complejo receptor TLR4/MD-2, por medio de simulaciones moleculares computacionales (acoplamiento molecular y dinámica molecular), aportará información que contribuya al desarrollo de nuevos compuestos en el tratamiento del choque séptico. Por lo tanto, el presente estudio, está enfocado en el análisis de la relación estructura-actividad del LPS y sus derivados, y a la comprensión a nivel molecular, de aquellas interacciones que regulan la activación/inhibición del complejo receptor TLR4/MD-2 y la proteína LBP en diferentes especies de mamíferos. Los resultados de este estudio computacional, serán representados en base al esquema de interacciones presentado en la **Figura 7** (derecha) [8].

Justificación

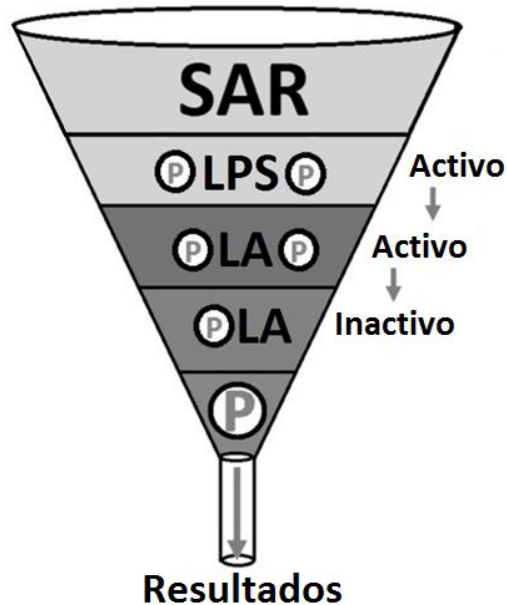


Figura 9. Detalles del diseño de este trabajo de investigación que refleja la justificación. La presente imagen esquematiza de forma resumida parte de lo hasta ahora expuesto en este trabajo de investigación. La relación estructura-actividad (SAR) está representada por la activación del complejo receptor TLR4/MD-2 por LPS. El LPS cuenta con una estructura responsable de la actividad, el lípido A (LA). En este trabajo se plantea que los grupos fosfato (P) son los responsables de la actividad especie-específica que desemboca en la activación de la respuesta inmune y la posible manifestación de sepsis [4,8].

El choque séptico es un problema de salud de incidencia desconocida en México. A pesar de lo anterior, es un problema de salud prevalente con elevada mortalidad y fuertes implicaciones sociales, laborales y económicas. No se ha logrado entender a fondo la forma en que el LPS y sus derivados interactúan con el complejo receptor TLR4/MD-2, debido al efecto dual dependiente de la especie que presentan moléculas como el L4a. Además, el sitio de unión a estas moléculas, no ha sido explorado en busca de interacciones con los grupos fosfato. Ambos aspectos son parte fundamental de este trabajo, y se integran al considerar a los grupos fosfato de estos ligandos como sonda de evaluación en el *Wedge* de cuatro especies de mamíferos. Lo anterior permitirá establecer si el efecto especie-específico que presentan estas endotoxinas depende de los grupos fosfato. Por lo que, el estudio y entendimiento de la relación estructura-actividad del Lipopolisacarido y sus derivados, así como el análisis de sus interacciones con sus dianas biomoleculares por métodos computacionales, puede facilitar el desarrollo de nuevos fármacos que ayuden en el tratamiento del choque séptico (**Figura 9**).

Objetivo General

Estudiar a nivel molecular la relación estructura-actividad de la endotoxina bacteriana LPS y sus derivados, así como sus interacciones moleculares con el complejo receptor TLR4/MD-2 y con la proteína LBP.

Objetivos particulares

- Analizar la secuencia aminoacídica de los complejos receptores de las cuatro especies de interés para la identificación de los residuos implicados en la activación del receptor.
- Obtener/Generar y refinar *in silico*, las estructuras moleculares derivados de LPS, así como el complejo Receptor TLR4/MD-2 y la proteína LBP.
- Modelar por homología del complejo receptor TLR4/MD-2 de la especie canina.
- Estudiar el acoplamiento molecular ligando-receptor o *docking* entre el L4a con el complejo receptor TLR4/MD-2.
- Analizar la preferencia posicional de los grupos fosfato del L4a como sonda de evaluación mediante dinámica molecular dentro del sitio de unión a LPS del complejo receptor TLR4/MD-2.
- Determinar la relación estructura-actividad, así como establecer si el mecanismo de interacción entre el LPS y sus derivados es dependiente de la especie, con el complejo receptor TLR4/MD-2.
- Simular el acoplamiento molecular ligando-receptor o *docking* entre el LA con la proteína LBP.

Metodología

En la **Figura 10** se esquematizan las diferentes etapas de este trabajo de investigación. Para el estudio de acoplamiento molecular, se realizó el análisis del L4a, en los complejos receptores de las especies humana, murina y equina. Con la proteína LBP de la especie murina (única cuya estructura ha sido resuelta por rayos-X) se estudió el acoplamiento del LA con la LBP.

Los análisis bioinformáticos, cálculos de mapas de potenciales de interacción, así como cálculos de propiedades electrostáticas del *Wedge* y las simulaciones por dinámica molecular (MD) se realizaron con los complejos receptores de las especies humana (h), murina (m, ratón), equina (e, caballo) y canina (c, perro). Empleando dinámica molecular, se analizó la preferencia de posición de los grupos fosfato en la interfaz de interacción en forma de cuña o *Wedge*. El grupo fosfato representa una sonda ideal para la búsqueda de interacciones electrostáticas dentro de esta interfaz, y se emplea la forma de fosfato diácido o monoaniónico (H_2PO_4^-) que presenta la misma carga de los grupos fosfato del LPS y de sus derivados (A1-A4, **Apéndice**). Para este último caso, en función de los resultados obtenidos se pueden hacer ajustes en las condiciones de cálculo (tamaño y forma de la celda, temperatura y tiempo de simulación, por mencionar algunos) o modificaciones en algunos parámetros (cargas de los grupos fosfato o de los residuos del *Wedge* por ejemplo) en favor del estudio (**Figura 10**, flecha punteada).

Lo anterior con el fin de aportar información a nivel molecular sobre si la actividad especie-específica que presenta el L4a depende del grupo fosfato.

Obtención y generación de los complejos receptores TLR4/MD-2 de las especies a analizar

La estructura cristalizada del complejo receptor TLR4/MD-2 de la especie humana fue obtenida de la base de datos PDB [25] (código PDB 3FXI [14]). De igual forma, la estructura del L4a fue obtenida de estructuras cristalizadas (código PDB 2E59 [26]). A la fecha, no se han resuelto las estructuras de los complejos receptores de las especies equina y canina. La estructura del complejo receptor de la especie equina y murina fueron modelados por homología en un trabajo previo [*T. Scior, comunicación personal*]. Finalmente, el complejo receptor de la especie canina fue modelado por homología en este trabajo de investigación.

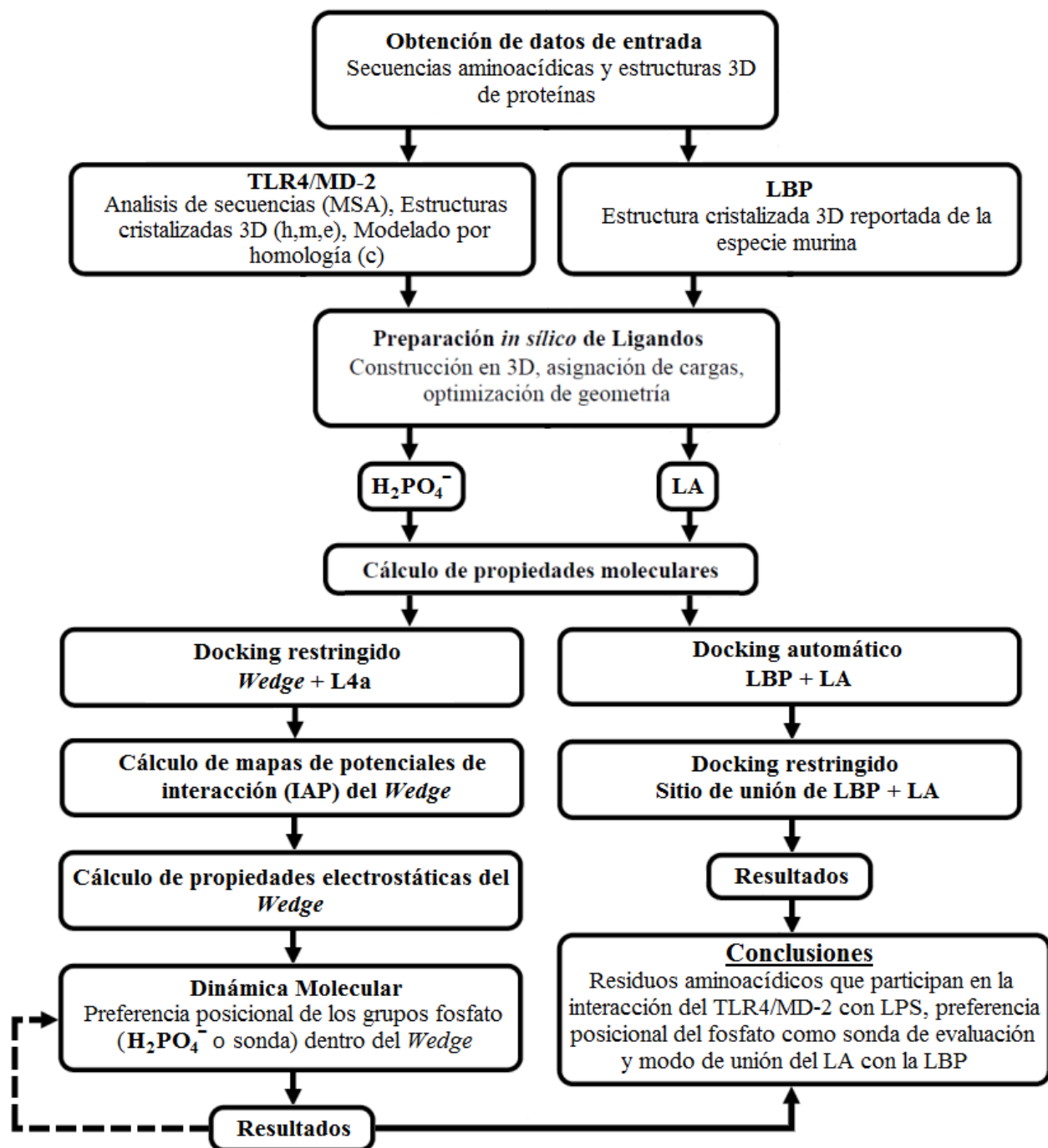


Figura 10. Esquema de trabajo. La línea punteada en la parte baja del esquema representa un paso que puede ser reiterativo, pues en función de los resultados obtenidos, se pueden refinar detalles o estrategias metodológicas en favor del estudio. La sonda utilizada para la evaluación de la preferencia posicional, es el grupo fosfato en su forma de fosfato diácido o H_2PO_4^- , en busca de interacciones dentro del *Wedge*. h: humano, c: canino, m: murino, e: equino, LBP: *LPS-binding protein*, LA: lípido A, L4a: lípido IVa PDB: *Protein Data Bank*.

Análisis bioinformático de las secuencias del complejo receptor TLR4/MD-2

Las secuencias del receptor TLR4 y su co-receptor MD-2 en las cuatro especies a estudiar, fueron obtenidas de la base de datos *Uniprot* [27] (códigos UniProt: **TLR4**. Humano: O00206, murino: Q9QUK6, equino: Q9MYW3, canino: F1PDB9. **MD-2**. Humano: Q9Y6Y9, murino: Q9JHF9, equino: Q6TGR2, canino: J9PAX4). El alineamiento múltiple de secuencias se realizó mediante el programa en línea *ClustalW* [28].

Modelado por homología del complejo receptor TLR4/MD-2 canino

El modelado por homología tiene como objetivo la generación de la estructura de proteínas o enzimas, cuya estructura no han sido resueltas por técnicas analíticas como difracción de rayos-X o resonancia magnética nuclear (RMN). Para esto, se requiere una estructura plantilla o molde que presente de preferencia un alto nivel de identidad (secuencias homologas con identidad mayor al 30% [29]) con la secuencia de la proteína/enzima o proteína blanco a modelar. En este trabajo se analiza la interacción de derivados del LPS o de sus partes con complejos receptores TLR4/MD-2 de cuatro diferentes especies, entre ellas la especie canina, cuya estructura se desconoce hasta la fecha. El complejo receptor TLR4/MD-2 canino fue modelado por homología tomando como plantilla la estructura del complejo receptor humano (código PDB 3FXI [14]). Esto se realizó mediante el programa *Scwrl 4.0* [30], que permite generar modelos tridimensionales controlando manualmente el alineamiento entre secuencias.

Estudio de acoplamiento molecular ligando-receptor o *docking*

El estudio de acoplamiento molecular ligando-receptor entre el L4a y el complejo TLR4/MD-2, y entre el LA y la proteína LBP murina, se realizó mediante el software *Autodock 4.2* por medio de la interfaz *Autodock tools* [19,20,31], para las especies humana, murina y equina, y tomando como base las estructuras cristalizadas reportadas (códigos PDB 3FXI y 2E59 [14,26]). El L4a cuenta con 4 cadenas acilo de 14 carbonos que presentan una gran cantidad de enlaces que pueden rotar, los cuales fueron restringidos por dos razones: 1) la documentación del programa señala que no es recomendable definir un número elevado de enlaces rotables (no mayor a 30), y 2) la capacidad de rotación de estos enlaces esta “naturalmente” restringida cuando se acopla a la cavidad hidrofóbica del MD-2, tanto por las interacciones hidrofóbicas presentes, como por el espacio disponible. Para las especies murina y equina, se extrajo el L4a de las estructuras

cristalizadas, y se insertaron en su interfaz de interacciones (*Wedge*) con las cadenas acilo en el interior de la cavidad hidrofóbica [32]. Dado que se conoce perfectamente el sitio de unión de LPS en el TLR4/MD-2, el estudio de acoplamiento está restringido (dirigido) a este sitio. El *docking* restringido, analiza el acoplamiento del ligando en un espacio de búsqueda definido o restringido por el usuario. Para el caso del acoplamiento del LA con la LBP se realizó un acoplamiento molecular automático (también llamado “a ciegas”), el cual ubica posibles sitios de unión en todo el receptor. Esto último se hizo para complementar el estudio reportado en la literatura que no logró identificar el sitio de unión a nivel molecular.

Adecuación de los complejos receptores para dinámica molecular

En su forma dimérica, cada complejo receptor activado presenta dos sitios de unión a LPS (*Wedge*). Dada la simetría del complejo receptor cada *Wedge* es en principio igual al otro. Por lo anterior, para las simulaciones por dinámica molecular se adecuaron complejos receptores de forma que sólo un *Wedge* fuera simulado y estudiado (**Figura 11**). El TLR4 presenta una estructura de hojas β (β -*helix*) que le otorgan rigidez y estabilidad, por lo que el MD-2* del TLR4* puede ser omitido, conservando un *Wedge* para el análisis de preferencia posicional mediante dinámica molecular.

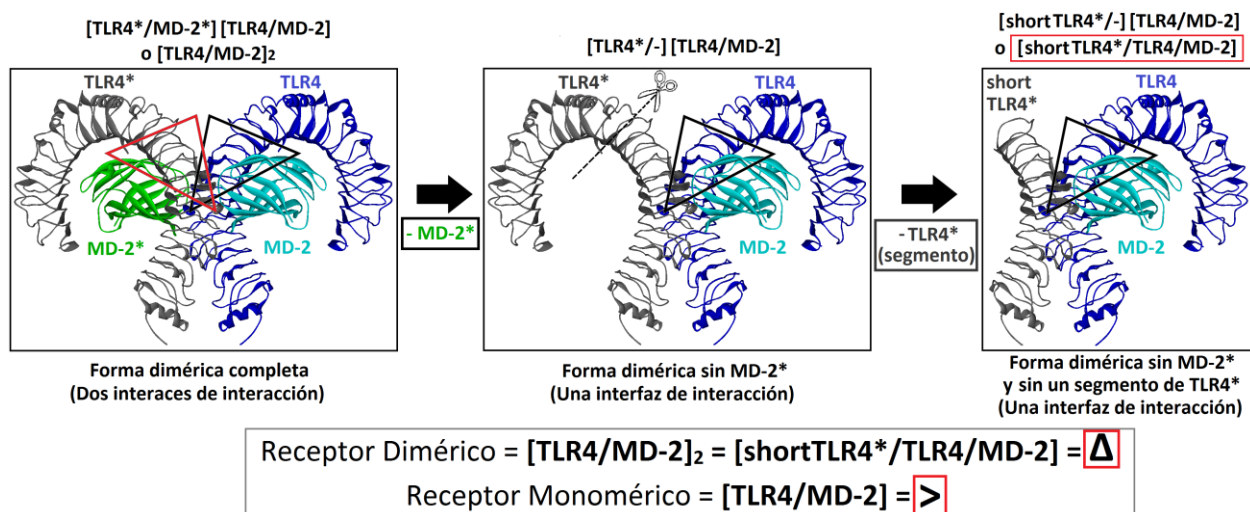


Figura 11. Adecuación del modelo del *Wedge* para la evaluación de la preferencia posicional de los grupos fosfato dentro del *Wedge* mediante dinámica molecular. Primero, la subunidad MD-2* fue removida de su correspondiente TLR4* (izquierda a centro), dejando únicamente un *Wedge*. Después, parte del TLR4 fue cortado y removido (centro a derecha), dejando un TLR4* corto (shortTLR4*) que interactúa con el otro monómero TLR4/MD-2, formando un único *Wedge*.

De los complejos diméricos cristalizados o modelados ([TLR4*/MD-2*][TLR4/MD-2] o [TLR4/MD-2]₂) el MD-2* fue removido y el TLR4* fue cortado en los complejos receptores de las cuatro especies (hSer312b a hCys627b, mSer310b a mPhe621b, eSer312b a ePhe624b and cSer311b a cCys627b, los cortes se hicieron en posiciones homólogas y la numeración está basada en la secuencia de la especie equina [32]), para generar complejos receptores con un *Wedge* ([shortTLR4*/-][TLR4/MD-2] o [shortTLR4*/TLR4/MD-2]).

Para los complejos receptores monoméricos, se retiraron las subunidades [TLR4*/MD-2*] cuando fue necesario (en **Resultados y Discusión** se ofrece una explicación al respecto en la **Tabla 5**), en particular para las especies murina y equina, donde el L4a se ha reportado como agonista o agonista parcial, respectivamente.

Evaluación de la preferencia posicional de los grupos fosfato dentro del *Wedge* mediante dinámica molecular

Cada uno de los pasos en los cuales se aplicó dinámica molecular, se realizaron con el programa *Gromacs* versión 5.0, el cual es ampliamente utilizado en la actualidad para el estudio de estructuras macromoleculares en función del tiempo [33-37].

Simulaciones iniciales de los grupos fosfato como sonda de evaluación dentro del *Wedge*

Se realizaron simulaciones iniciales para observar los perfiles de interacción de los grupos fosfato (H_2PO_4^- , utilizados como sonda de evaluación) en complejos receptores diméricos para tener *Wedges* completos y evitar la salida de la sonda. Cada sistema con tres fosfatos ([shortTLR4*/TLR4/MD-2/3 H_2PO_4^-] o [shortTLR4*/TLR4/MD-2/3P]), uno en cada sitio del *Wedge*, fue sometido a minimización de energía (st: *steepest descent*), posteriormente se equilibraron sus energías en un ensamble canónico (NVT: Numero de átomos, volumen y temperatura constantes en un sistema cerrado) a 300 K por 0.4 ns y después en un ensamble isobárico-isotérmico (NPT: Número de átomos, presión y temperatura constante en un sistema abierto) a 300 K por 1 ns, con una dinámica molecular en un ensamble NPT a 300 K por 50 ns [38,39], ventana de tiempo suficiente para que los fosfatos exploren diferentes posiciones en el *Wedge*. Para estas ejecuciones se definieron celdas de simulación o cajas dodecahédricas, que a diferencia de las cúbicas, admiten menos moléculas de agua disminuyendo el número de átomos

y en consecuencia, el tiempo de cómputo. Estas simulaciones se realizaron en el servidor “Aquila” del Instituto de Física “Ing. Luis Rivera Terrazas”, BUAP.

Preferencia posicional de los grupos fosfato como sonda de evaluación dentro del *Wedge*

Estas simulaciones se realizaron con dos grupos fosfato para evaluar la preferencia posicional especie-específica. Los complejos receptores (diméricos [shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P] y monoméricos [TLR4/MD-2/2P]) fueron sometidos a minimización de energía (st). Posteriormente, se equilibraron sus energías en un ensamble NVT a 310 K por 0.1 ns y después en un ensamble NPT a 310 K por 0.15 ns, con una dinámica molecular en un ensamble NPT a 310 K por 100 ns. De forma sistemática, los dos fosfatos fueron colocados primero en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) en controles positivos y negativos. Posteriormente y con los mismos controles, se simularon los grupos fosfatos en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) para evitar el sesgo de la posición inicial, por lo que en total se simularon dieciséis sistemas. Para este caso se definieron cajas cúbicas, que si bien admiten un mayor número de moléculas de agua, evitan algunos inconvenientes de las cajas dodecahédricas. El análisis de resultados y la visualización de los mismos se realizaron con el programa *VMD*, los gráficos de distancias de interacción *versus* tiempo fueron generados con el programa *Grace* [40,41].

Una vez adecuados y generados los ocho complejos receptores (**Tabla 5**) para las cuatro especies, se empleó dinámica molecular para la observación de la preferencia posicional del grupo fosfato en la interfaz de interacción en forma de cuña o *Wedge* [8,32]. Estos cálculos se realizaron gracias al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS, CONACYT).

Cálculo de mapas de potenciales de interacción y propiedades electrostáticas del *Wedge*

El cálculo de los mapas de potenciales de interacción (IAP) permite visualizar mediante proyecciones de colores, las diferentes zonas donde una sonda definida tiene mayor capacidad de interactuar con un blanco biomolecular. Para el presente estudio, se evaluó el potencial de interacción del grupo fosfato como sonda dentro del *Wedge*. Así mismo, se calcularon las propiedades electrostáticas de los complejos receptores de las cuatro especies. Estas propiedades son proyectadas también con colores sobre la superficie de *Van der Waals* del receptor representando zonas ácidas, básicas o hidrofóbicas. Lo anterior se realizó con el programa MOE 2014 [42].

Resultados y discusión

Análisis bioinformático de las secuencias del complejo receptor TLR4/MD-2

Las diferentes estructuras cristalizadas de los complejos receptores TLR4/MD-2 reportadas a la fecha, así como sus actividades biológicas se resumen en la **Tabla 1**. Nuevas estructuras reportadas en años recientes (código PDB 5IJD [43]) están en perfecta relación con las estructuras cristalográficas y efectos biológicos reportados en trabajos previos [8,32].

Cabe señalar nuevamente, que este análisis se hace para estudiar la actividad especie-específica que presenta el L4a, proponiendo a los grupos fosfato como responsables de este efecto dependiente de la especie.

Tabla 1. Actividades biológicas observadas y estructuras cristalizadas reportadas con LPS y/o derivados asociados al complejo receptor TLR4/MD-2. Simbología: Ag: agonista, An: Antagonista, (Ag/An): Actividad parcial; dímero en forma de “m”, MD-2 en forma de “u”; “Δ” *Wedge* completo (dímero), “>” *Wedge* incompleto (monómero, sin TLR4*), “-“ MD-2 únicamente. Er: Eritoran. [32].

Ligando\Especies	h	m	e	c
LPS	Ag [TLR4/MD-2/LPS]2 “m” “Δ” 3FXI [14], 4G8A [44]	Ag [TLR4/MD-2/LPS]2 “m” “Δ” 3VQ2 [7]	Ag -	Ag -
LA	Ag -	Ag [TLR4/MD-2/LA]2 “m” “Δ” 5iJD [43]	Ag -	Ag -
L4a	An [-/MD-2/L4a]1 “u” “-” 2E59 [26]	Ag [TLR4/MD-2/L4a]2 “m” “Δ” 3VQ1 [7]	(Ag) -	(An) -
Er (Eritoran)	An [TLR4/MD-2/Er]1 “>” 2Z65 [45]	An -	An -	An -

En la notación que se utilizará en adelante para los residuos aminoacídicos del *Wedge*, al inicio de una expresión, se utilizan las letras h, m, e, c, para referirse a las especies humana, murina, equina y canina, respectivamente. Después, se utiliza la abreviatura de tres letras de cada residuo aminoacídico seguida del número, y al final, se coloca una letra minúscula que corresponde a cada subunidad proteica del complejo receptor (a=TLR4, b=TLR4* y c=MD-2). Así, por ejemplo, la expresión “hLys122c” se refiere al residuo de lisina 122 de la subunidad MD-2 (c) del complejo receptor de la especie humana (h).

Los resultados de los alineamientos o MSA (MSA: *multiple sequence alignment*) para los TLR4 y los MD-2 de las 4 especies se muestran en la **Figura 12** y **Figura 13**, respectivamente. En ellos se señalan además, aquellos residuos reportados que participan en la interacción del LPS o sus derivados con el complejo receptor TLR4/MD-2 [8,32].

Los porcentajes de identidad entre cada especie se muestran en la **Tabla 2** y **Tabla 3**, para el TLR4 y MD-2, respectivamente.

	<u>gap</u>	
hTLR4 O00206	MMSASRLAGTLIPAMAFSLCVRPESWEPCVEVVPNITYQCMELNIFYKIPDNLPPFSTKNLD	60
cTLR4 F1PDB9	MMSPTRLVGIIPAMAFSLCVRPESWDPCMQVVANTTYQCMELNLSKIPNNIPTSTEKLD	60
mTLR4 Q9QUK6	MMPWLLARTLIMAL-FFSCLTPGSLNPCIEVVPNITYQCMDQKLSKVPDDIPSSSTKNID	59
eTLR4 Q9MYW3	MMPPTRLAGTLIPAMAFSLCVRPESWDPCVQVVPNTTYQCMDLNLYKIPENIPTSTEKELD	60
	* * . . * . * * * : * : * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : *	
hTLR4 O00206	LSFNPLRHLGYSFFSFPPELQVLDLSRCEIQTIEDGAYQSLSHLSTLILTGNPIQSLALG	120
cTLR4 F1PDB9	LSFNPLRHLGSHCFSNFPKQLVLDLSRCEIQVIEDDAYQGLNHLNILILTGNPIQRLFPFR	120
mTLR4 Q9QUK6	LSFNPLKILKYSFSFNFSELQVLDLSRCEIETIEDKAWHGLHLSNLILTGNPIQSFSPG	119
eTLR4 Q9MYW3	LSFNPLKELGSHSFSNFPELQVLDLSRCEIEMIEDDAYQGLNHLSTLILTGNPIRSLALG	120
	***** : * * : * . * . * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : *	
hTLR4 O00206	AFSGLSSLQKLVAVETNLASLENFPIGHLKTLKELNVAHNLIQSFKLPEYFSNLTNLEHL	180
cTLR4 F1PDB9	AFSGLSSLKTLVAKETKLTSLDFPIGHLKTLKELNVAHNLIHSFKLPAYFSNMPNLENV	180
mTLR4 Q9QUK6	SFSGLTSLNLAHVETKLSLESFPIQLITLKKLNVAHNFHSCKLPAYFSNLTNLVHV	179
eTLR4 Q9MYW3	AFSGLSSLQTLVAVETKLSLEKFPPIGHLKTLKELNVAHNLIHSFKLPEYFSKMPNLEHL	180
	: * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : *	
hTLR4 O00206	DLSSNKIQSIYCTDLRVLHQMPLLNLSLDLSLNPMPFIQPGAFKEIRLHKLTLRNPFDSL	240
cTLR4 F1PDB9	DLSNKKIQNIYREDLQVLHHPMLNLSLDLSLNPFIYFIQPGSFKEIKLHKLTLRNPFNST	240
mTLR4 Q9QUK6	DLSYNYIQTITVNDLQFLRENQVNLSDMSLNPIDFIQDQAFQGIKHELTLRGNFNS	239
eTLR4 Q9MYW3	DLSNKKIQNISHEDLRVLHQMPLLNLSLDLSLNPLEFIQPDFAFKEIKLHKLTLRNPFDSI	240
	*** * * * * * * : * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : *	
	<u>264a</u> <u>gap</u>	
hTLR4 O00206	NVMKTCIQGLAGLEVHRLVLGFEFRNEGNLEKFDKSALEGLCNLTIEEFRLAYLDYYL-DD	299
cTLR4 F1PDB9	DVMKTFIQGLAGLQVLVLGFEFKNERKLESFDNSLLEGLCNLTIEKFRIAYFDSFS-KD	299
mTLR4 Q9QUK6	NIMKTCLQNLAGLHVHRLVLGFEFKDERNLEIFEPSIMEGLCDVTIDEFRLTYTNDFS--D	297
eTLR4 Q9MYW3	DVMKSCIQGLAGLQVNRVLVLGFEFKNERKLERFDTLSALRGLHNLITIEEFRLAYIDNYSSK	300
	: * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : *	
	<u>322a</u> <u>342a</u> <u>344a</u>	
hTLR4 O00206	IIDLFNCLTNVSSFSLSVSVTIERVKDFSYNFGWQHLELVNCKFGQFPPTLKLKSLKRLTFT	359
cTLR4 F1PDB9	TTNLFNQLVNI SAISLAHLVLDTPKYL PKNLRWQRLEIVNCNLEQFPWELDSLKEFVLT	359
mTLR4 Q9QUK6	DIVKFHCLANVSAMSLAGVSIKYLEVDVPHFKWQSLSIIRCQLKQFPPTLDLPFLKSLTTLT	357
eTLR4 Q9MYW3	SIDLLNCLADISKISLVSLDLGNLKDFFPKFGWQDFELVNCRIEFGPPTLELTSLKRLVFT	360
	: * . : * * : * * . : : * . : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	
	<u>363a</u> <u>370b</u> <u>385a</u> <u>389b</u> <u>394b</u> <u>398b</u>	
hTLR4 O00206	SNKGGNAFSEVVDLPSLEFLDLSRNGLSFKGCCSQSDFGTSLKYLDLSFNQVITMSSNFL	419
cTLR4 F1PDB9	SNKGMNTFADMKMESLEFLDLSRNRLSFKTCCSHSDFGTTRLKHLDLSFNIEITMSSNFL	419
mTLR4 Q9QUK6	MNKGSISFKKVALPSLSYLDLSRNRLSFSGCCSYSDLGTNSLRHLDLSFNIAIIMSANFM	417
eTLR4 Q9MYW3	SNKDKMSFNEVKLPSLEFLDLSRNRLSFKSCCSADLKTTRLKHLDLSFNVDVIMSSNFM	420
	* * . : * . : : * * : * * * * * * * * * * * * : * * : * * : * * * : *	
	<u>437b</u> <u>440b</u> <u>449b</u>	
hTLR4 O00206	GLEQLEHLDFQHNSNLQMSSEFSVFLSLRNLIYLDISHTHTRVAFNGIFNGLSSLEVLKMA	479
cTLR4 F1PDB9	GLEQLEYLDLQHSNLQASDFSVFLSLRNLIYLDISYTRTEVAFQGFIDGLVSLLEVLKMA	479
mTLR4 Q9QUK6	GLEELQHLDFQHSTLKRVTSEFAFLSLEKLLYLDISYTNKIDFDGIFLGLTSLNLTLMMA	477
eTLR4 Q9MYW3	GLEQLEHLDFQHSTLQASDFPVFLSLKLNLIYLDISYTNTRVVFHGFIDGLVSLQVLKMA	480
	*** : * : * * : * * * : * * : * * * : * * : * * * : * * : * * * : * * * : *	
hTLR4 O00206	GNSFQENFLPDIFTELRLNLTFLDLSQCQLEQLSPTAFNSLSSQLVNMSSHNNFFSLDTPF	539
cTLR4 F1PDB9	DNSFPDNLSPNIFKGLTNLTILDLSRCHLERVQSSEFVSLPKLQEIINMSSHNSLLSLDTPF	539
mTLR4 Q9QUK6	GNSFKDNTLSNVFANTNLTFDLDSKQLEQISWGVDFTLHRLQLLNMSSHNNLLFLDSSH	537
eTLR4 Q9MYW3	GNSFKDNFLPNIFREMTNLTTLTDLKCNLEQVQSQAFCCLPRLVRLNMSSHNNLLFLDMLP	540
	. * * * : * * : * * * * * * * * * * * * : * * : * * : * * * : *	


```

                                hY42c                                58c
hMD2|Q9Y6Y9|      MLPFLFFSTLFFSIFTEAQQYWVCNSSDASISYTYCDKMQYPIVINVNPCIELKRSKG 60
mMD2|Q9JHF9|      MLPFILFSTLLSPILTESEKQQWFCNSSDAIISYSCDHLKFPISISSEPCIRLRGTNGF 60
eMD2|Q6TGR2|      MFSFMLFFSTLFFSIFPEPEELRWICNSSDMSIWYTYCDNMKSPISINLEPCIELKGTRGH 60
cMD2|J9PAX4|      MFPFMLFSTLFFSIFTEPGEQYWICNSSDASVWYTYCDYMKAPISIDLNPCIAMKGSKGY 60
*.:*:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
                                M85c R90c
                                mV61c                                v82c L87c
hMD2|Q9Y6Y9|      LHIFYIPRRDLKQLYFNLYITVNTMNLPKRKEVICRGSDDDDYSFCRALKGETVNTTISFS 120
mMD2|Q9JHF9|      VHVEFIPRGNLKYLYFNLFISVNSIELPKRKEVLCHGHDDDDYSFCRALKGETVNTSIPFS 120
eMD2|Q6TGR2|      LHMLFVPRRDIKKLYFNLYLTMNSLEFPMRKEVICRGSDDDDYSFCRALKGETVNTTVSFS 120
cMD2|J9PAX4|      LHLYYIPRRDIKKLYFNLYISFNSMNLPMRKEVICRGSDDVYSFCRALKGETVDTRIPFS 120
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
122c 125c
hMD2|Q9Y6Y9|      FKGIKFSKGYKCVVEAISGSPEEMLFCLFVILHQPN 160
mMD2|Q9JHF9|      FEGILFPKGYRCVAEIAGDTEEKLFCLNFTIIHRRDVN 160
eMD2|Q6TGR2|      FRGMRFPKGRYSCIAEAVVGNTEELFCLNFTLLHQPSFN 160
cMD2|J9PAX4|      FRGIRFSGQYNCVVEAISGDTEEKLFCLNFTVIHHPDFN 160
*.:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

Figura 13. MSA de los MD-2 de las cuatro especies analizadas en este trabajo. La letra “c” después de cada residuo resaltado en el alineamiento, reportado en la literatura se refieren simplemente al MD-2 [32].

Tabla 3. Porcentajes de identidad del MD-2 de las cuatro especies a estudiar obtenidos por MSA con *ClustalW*. Las letras antes de cada MD-2, especifican la especie de la que se trata (h: humano, m: murino, e: equino, c: canino).

No.	EspecieMD-2 código Uniport	Longitud	No.	EspecieMD-2 código Uniport	Longitud	% Identidad
3	eMD2 Q6TGR2	160	4	cMD2 J9PAX4	160	71.88
1	hMD2 Q9Y6Y9	160	2	mMD2 Q9JHF9	160	63.75
1	hMD2 Q9Y6Y9	160	3	eMD2 Q6TGR2	160	65.62
1	hMD2 Q9Y6Y9	160	4	cMD2 J9PAX4	160	71.88
2	mMD2 Q9JHF9	160	3	eMD2 Q6TGR2	160	60.62
2	mMD2 Q9JHF9	160	4	cMD2 J9PAX4	160	65.62

Modelado por homología del complejo receptor TLR4/MD-2 de la especie canina

Mediante MSA de los receptores para las cuatro especies a analizar (humano, ratón, caballo y perro) se ha determinado que todos los complejos receptores son homólogos, pues comparten una identidad mayor al 60% [29]. El complejo receptor TLR4/MD-2 de la especie canina fue modelado por homología tomando como plantilla el complejo receptor cristalizado de la especie humana (código PDB 3FXI [14], porcentajes de identidad: TLR4: 73%; MD-2: 71%). Al superponer o alinear ambas estructuras (**Figura 14**), se obtiene un RMSD = 0.03 Å (*Root Mean Square Distance*), lo cual habla de estructuras sumamente similares, y en consecuencia, de una gran calidad del modelo generado. Posterior al modelado, el complejo receptor canino fue preparado para dinámica molecular como los de las otras tres especies (**Metodología, Figura 11**).

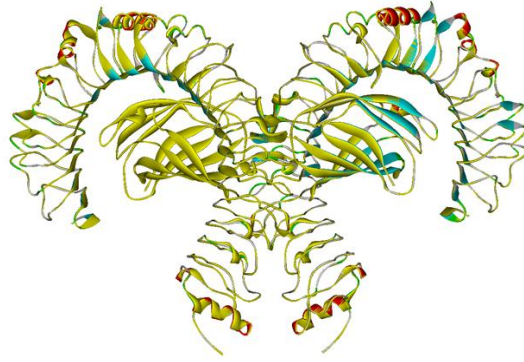


Figura 14. Modelo 3D del complejo receptor canino modelado por homología (amarillo) superpuesto con la estructura del receptor cristalizado de la especie humana (3FXI [14], rojo y azul).

Estudio de acoplamiento molecular del L4a y el complejo receptor TLR4/MD-2

Mediante acoplamiento molecular para el L4a, se han establecido modelos de interacción con el complejo receptor TLR4/MD-2 para las especies murina, equina y humana (**Figura 15**) [32]. Estas interacciones están representadas dentro del *Wedge*, lo que facilita su visualización e interpretación de acuerdo a lo reportado en la literatura [8]. La adecuación de los complejos receptores señalada en **Metodología** (**Figura 11**), no se realizó con los receptores empleados para el estudio de acoplamiento molecular, pues el número de átomos no es un factor que determine o afecte el tiempo de simulación en este caso.

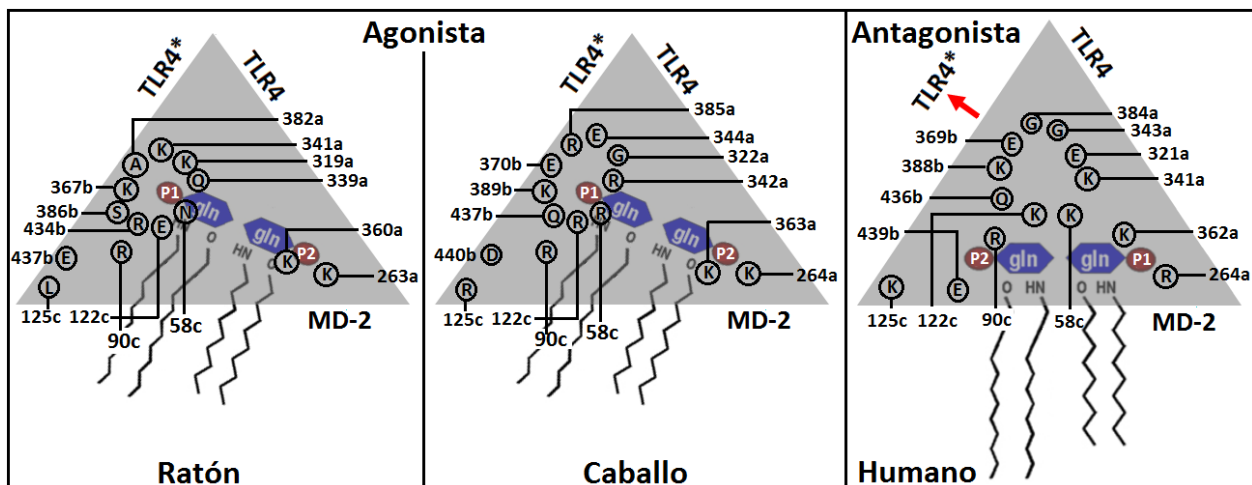


Figura 15. Modelos de interacción propuestos para el L4a en su forma agonista de ratón y caballo (**izquierda y centro**, respectivamente) y antagonista humano (**derecha**) basadas en el estudio *docking* [32]. En el caso del L4a como antagonista en humano (derecha), la flecha indica repulsión del TLR4*, evitando la dimerización del complejo TLR4/MD-2/L4a, y en consecuencia, la activación de la respuesta inmune innata. Las líneas y las letras minúsculas en cada residuo, indican la entidad proteica a la que pertenecen (a=TLR4, b=TLR4*, c=MD-2) [32].

Como se ha mencionado, para activar la respuesta inmune, se tiene que dar la dimerización del complejo receptor TLR4/MD-2, por lo que el L4a como agonista no solo debe de interactuar con ambos co-receptores, sino que debe también formar interacciones con un TLR4* (**Figura 7 y Figura 15**).

En los modelos de interacción propuestos en la **Figura 15**, se puede observar que en el caso de la especie murina los residuos de lisina (mLys319a, mLys367b) y un residuo de arginina (mArg434b), atraen al grupo fosfato de la GlcN I (P1). Además, se puede observar que un residuo de ácido glutámico del MD-2 (mGlu122c) repele o “empuja” al P1 hacia arriba, desplazando al L4a fuera de su cavidad lo que favorece su interacción con los residuos de lisina y arginina ya mencionados: Esto explica, en parte, el porqué de su posición agonista, ya que el L4a se encuentra más expuesto que en la forma antagonista. Algo similar sucede con la especie equina, donde al parecer, las tres subunidades del receptor, contribuyen con residuos que favorecen el posicionamiento del P1 en el sitio Pag.

En la especie humana (L4a como antagonista), un residuo de arginina del MD-2 (hArg90c) mantiene al L4a inmerso en su cavidad hidrofóbica por medio de interacciones electrostáticas con el fosfato de la GlcN II (P2), a la vez que hay repulsión con el ácido glutámico (hGlu439b) del TLR4*, lo que implica que el grupo fosfato P2 no pueda desplazarse a la zona de interacción que favorece la dimerización, ni que el TLR4* pueda formar interacciones con otro complejo TLR4/MD-2. Además, la presencia de ácidos glutámicos (hGlu369b, hGlu321a) no favorece el posicionamiento del P2 en el sitio Pag.

Evaluación de la preferencia posicional de los grupos fosfato dentro del *Wedge* mediante dinámica molecular

En este trabajo se postula al grupo fosfato como la parte que confiere endotoxicidad a derivados del LPS. De esta manera, este grupo funcional, al poseer carga, representa una sonda que permitirá evaluar las interacciones electrostáticas más relevantes que conllevan a la activación o inhibición del complejo receptor, lo cual, como se ha propuesto, depende de la especie en que sea evaluado. Las preferencias posicionales observadas a lo largo del tiempo pueden ofrecer una respuesta a esto. Para eso, se requiere establecer cargas adecuadas por medio de simulaciones donde se evalúan los perfiles de interacción de los grupos fosfato dentro del *Wedge*.

Simulaciones iniciales de los grupos fosfato como sonda de evaluación dentro del *Wedge*

Para la evaluación de la preferencia posicional del grupo fosfato por dinámica molecular, se realizó un análisis inicial de las interacciones de los grupos fosfato, diseñados con base a lo reportado en la literatura (A1-A4, **Apéndice**) [46]. Se analizaron únicamente los grupos fosfato por dos razones: a) monitorear la posición de estos grupos funcionales en función del tiempo de manera especie-específica y b) ahorro del tiempo de cálculo al evaluar únicamente una parte del LPS que resulta fundamental para su efecto biológico (**Figura 9**) [4,8].

A su vez, se han generado los *scripts* o programas correspondientes para la preparación del sistema y ejecución de la dinámica en el lenguaje *Shell* del Linux.

Como una primera prueba, se colocó un grupo fosfato en la posición PagPan del *Wedge*, se ejecutó dinámica molecular a 300 K en una ventana de tiempo de 20 ns, suficiente para observar el desplazamiento molecular de los fosfatos en el complejo receptor humano dimérico (h[TLR4/MD-2]₂, en estas pruebas en particular, no se hizo adecuación del complejo receptor), con el programa *Gromacs* [33-37]. Las distancias interatómicas del grupo fosfato con los residuos hArg264a y hLys362a del sitio PagPan, resultado de estos experimentos se muestran en la **Figura 16**.

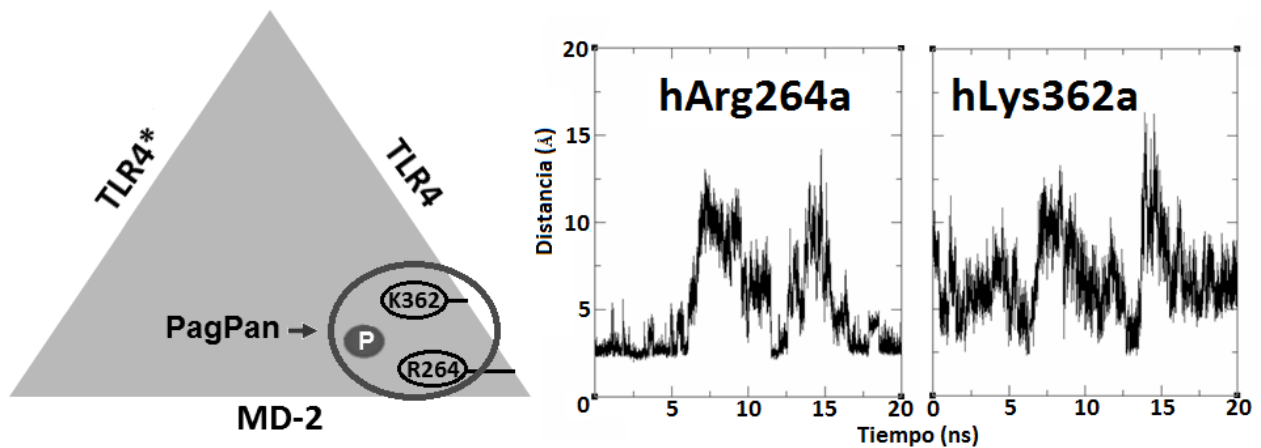


Figura 16. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato y los residuos del sitio PagPan del *Wedge* de la especie humana (círculo) generados por dinámica molecular. La ventana de observación es de 20 ns.

La **Figura 16** intenta representar que el grupo fosfato, muestra preferencia posicional en el sitio PagPan a lo largo de los 20 ns, ubicándose por momentos a una distancia de aproximadamente 2.5 Å de la hArg264a en diferentes momentos (**Figura 16**, gráfico central); ello no ocurre con el residuo hLys362a, con el que interactúa de forma esporádica. Dada la gran cantidad de información que se genera en cada simulación por dinámica molecular (15 a 20 Gb para 20 ns), esta ventana de tiempo resulta adecuada para estas pruebas, donde no se observa una clara tendencia a interactuar por un residuo, lo cual sirvió para establecer las cargas parciales para los átomos de las cadenas laterales de los residuos del *Wedge*. Estas pruebas permitieron observar que la inclusión de muchas moléculas de agua aumentaba demasiado el tiempo de cálculo, sobre todo en celdas de simulación o cajas cúbicas. Además, dada la simetría del complejo receptor resultó claro que no era necesario el evaluar ambos *Wedges*. Estas dos últimas observaciones motivaron a la adecuación del complejo receptor descrita con anterioridad en Metodología.

Habiendo establecido cargas a las cadenas laterales de los residuos del *Wedge*, se procedió nuevamente a evaluar las preferencias posicionales pero esta vez con tres fosfatos, uno en cada sitio del *Wedge*, esta vez en los complejos receptores preparados ([shortTLR4*/TLR4/MD-2]).

La inclusión de 3 grupos fosfato puede parecer algo incorrecto, pero resulta útil por varias razones: i) se reduce el tiempo de cálculo al observar la preferencia del fosfato en los 3 sitios reportados; ii) una vez que el fosfato se une a sus sitios preferidos, ya sea en forma agonista o antagonista según la especie, otro grupo fosfato es “forzado” a explorar el resto del *Wedge* en busca de interacciones favorables con otros residuos, lo que podría proporcionar información útil sobre otros posibles sitios de interacción; iii) los fosfatos no interactúan entre sí, al tener la misma carga, hay efectos de repulsión entre estos; y iv) permite observar la tendencia de un ligando para comportarse como agonista o antagonista en una misma especie o posiblemente establecer cuál es la conformación más favorable. En la **Figura 17** se muestra en forma visual la preferencia posicional de los tres fosfatos dentro del *Wedge* en estas simulaciones iniciales.

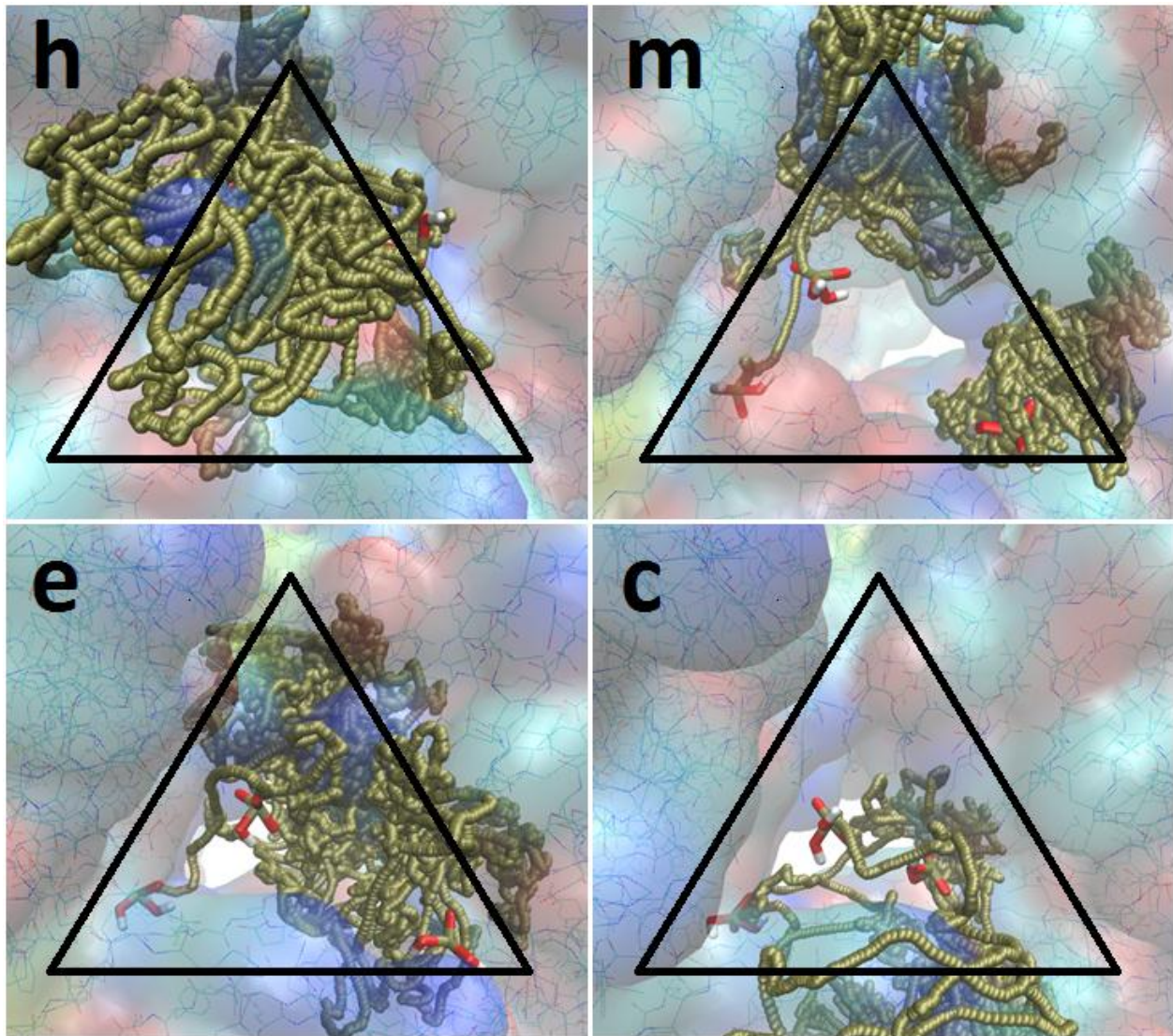


Figura 17. Preferencias posicionales de la sonda en experimentos iniciales; **Izquierda arriba:** *Wedge* dimérico humano (h); **Derecha arriba:** *Wedge* dimérico murino (m); **Izquierda abajo:** *Wedge* dimérico equino (e). **Derecha abajo:** *Wedge* dimérico canino (c).

En la **Figura 17** se observan las preferencias posicionales de los tres grupos fosfato en cada especie estudiada. Para lograr esta visualización, los diferentes estados o pasos generados durante la dinámica molecular (*time frames*) fueron superpuestos y el triángulo del *Wedge* fue colocado lo más representativamente posible. En la **Tabla 4** se resumen y comparan los efectos simulados contra los efectos esperados de cada grupo fosfato, estos últimos establecidos en base a lo observado en estructuras cristalizadas y reportes de la literatura. En el efecto esperado (2ª

columna **Tabla 4**) se muestra la posición inicial del fosfato y el sitio al cual se espera (o no) que el fosfato se mueva o explore.

Tabla 4. Preferencias posicionales de la sonda en simulaciones MD iniciales. En el efecto esperado (2ª columna). Se muestran únicamente las preferencias posicionales de las sondas esperadas, en base a los efectos observados pro estructuras cristalográficas. Además, se muestran los residuos con los que el fosfato mostró interacción durante la simulación MD. O: La sonda salió del *Wedge*. La expresión “no Pan” en este caso, indica que no se espera que el fosfato muestre preferencia por el sitio Pan.

Especie	Efecto esperado	Efecto simulado	Comentarios
Humano (h)	Pag>Pag Pan>no Pan PagPan>PagPan	Agonista Pag>Pag(Lys388b) Pan>O>Pag>PagPan>O (Lys122c) PagPan>PagPan(Lys58c) PagPan>PagPan(Lys362a)	El TLR4* no debería estar presente en una situación antagonista (unido a L4a). En la situación actual, y tomando con referencia a lo reportado del efecto del L4a, esto representa un control negativo. El fosfato en posición Pan no mostró preferencia dentro del <i>Wedge</i> .
Murino (m)	Pag>Pag Pan>Pag PagPan>PagPan	Agonista Pag>Pag>O(Ser386b, Lys367b, Lys341a, Arg434b) Pan>Pag(Lys341a) PagPan>PagPan(Lys263a)	El TLR4* debe estar presente en agonistas. Dado que esta estructura ha sido reportada con L4a, representa un control positivo.
Equino (e)	Pag>Pag Pan>Pag PagPan>PagPan	Agonista Pag>Pag(Lys389b) PagPan>PagPan(Lys363a, Asn340a) Pan>Pag/PagPan	El TLR4* debe estar presente en agonistas. Dado que esta estructura ha sido reportada con L4a, representa un control positivo. El fosfato en posición Pan se mantuvo fuera de <i>Wedge</i> sin mostrar clara interacción con algún residuo.
Canino (c)	Pag>Pag Pan>no Pan PagPan>PagPan	Antagonista (dudoso) Pag>O>Pag>PagPan(Lys58c) PagPan>PagPan(Lys264a) Pan>PagPan(Lys362a)	El TLR4* no debería estar presente en una situación antagonista (unido a L4a). En la situación actual, y tomando con referencia a lo reportado del efecto del L4a, esto representa un control negativo.

Los resultados de la **Figura 17** y de la **Tabla 4** nos ofrecen un primer acercamiento a los residuos que pueden interactuar con los grupos fosfato, y en cierta forma a lo que se puede esperar en las simulaciones de la preferencia posicional de los grupos fosfato, pero no son contundentes en cuanto al efecto especie-específico, y esto se debe en parte e irónicamente a la presencia de los tres grupos fosfato. La evaluación de la preferencia posicional se realizó en presencia de dos fosfatos, que sería la situación natural en presencia de un ligando di-fosfatado, lo que evita la mutua influencia o interferencia que existe entre las sondas cuando se colocan tres en cada sitio

del *Wedge*. Gracias a estas pruebas al inicio del estudio, se establecieron las condiciones para tales simulaciones MD. Las cargas parciales establecidas se muestran en el **Apéndice** (A5).

Las primeras simulaciones permitieron establecer cargas y evaluar tiempo de cómputo además de otros aspectos técnicos. Pero además, estas simulaciones no tienen un sentido biológico ni bioquímico al haberse llevado a cabo en todos los casos con complejos receptores diméricos, lo cual se hizo principalmente para evitar la salida de la sonda del *Wedge*. Pero lo anterior no es un reflejo de un comportamiento “natural” pues desde el punto de vista del L4a, antagonista en humano y canino, el TLR4* no debería estar presente en ambos complejos receptores a simular. Así, estas simulaciones permitieron además establecer controles en función del efecto observado en estructuras cristalográficas, lo cual facilita la interpretación de resultados al otorgar un sentido biológico a la evaluación de la sonda. Los gráficos de interacción obtenidos de estas simulaciones para cada especie se muestran en el **Apéndice** (A6). Gracias a las simulaciones iniciales (pero no sistemáticas con respecto a la dimerización y las especies a estudiar) y concluidas con éxito se conoce el comportamiento a investigar, esta vez de forma sistemática.

Preferencia posicional de los grupos fosfato como sonda de evaluación dentro del *Wedge*

Antes de emplear dinámica molecular para evaluar la preferencia posicional de los grupos fosfato del L4a, se definieron controles positivos y negativos en función de las estructuras cristalográficas disponibles (**Tabla 5**). Lo anterior nos permite simular una situación “natural” (o artificial) dependiendo del efecto observado en cada especie y así poder establecer si el fosfato en realidad determina el comportamiento especie-específico de este tipo de moléculas.

Tabla 5. Listado sistemático de los ocho modelos de los *Wedges* generados para MD y su relación con la actividad reportada. Ag: agonista, An: Antagonista, (Ag/An): Actividad parcial; dímero en forma de “m”, MD-2 en forma de “u”; “Δ” *Wedge* completo (dímero), “>” *Wedge* incompleto (monómero) h: humano, m: murino, e: equino, c: canino.

Natural	Artificial
Observado en complejos cristalizados	No observado por cristalografía
Control positivo para L4a	Control negativo para L4a
1) m[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P] Ag “Δ”	3) h[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P] Ag “Δ”
2) e[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P] Ag “Δ”	4) c[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P] Ag “Δ”
5) h[TLR4/MD-2/2P] An “>”	7) m[TLR4/MD-2/2P] An “>”
6) c[TLR4/MD-2/2P] An “>”	8) e[TLR4/MD-2/2P] An “>”

Los controles positivos (**Tabla 5**) reflejan una situación “natural” que ha sido observada por estructuras cristalizadas, mientras que los controles negativos representan una construcción “artificial” que no se ha observado por rayos-X. La definición de controles nos permite establecer una expectativa del efecto a simular para establecer si los grupos fosfato presentan un comportamiento especie-específico dentro del *Wedge*. De acuerdo a lo anterior, los efectos esperados se esquematizan en la **Figura 18**. El establecimiento de controles nos otorga además una forma de calibración en estas simulaciones. Este diseño de estudio tiene la intención de permitir la aplicabilidad a todos los ligandos semejantes al LPS. Si el fosfato fuese un reflejo del L4a, entonces se excluiría su interpretación como parte del LA o LPS (que no resulta cierto: en el caso del sistema humano se evidencia, pues se presenta un cambio de actividad agonista o antagonista, mientras que en ratón, ambos ligandos tienen un efecto agonista).

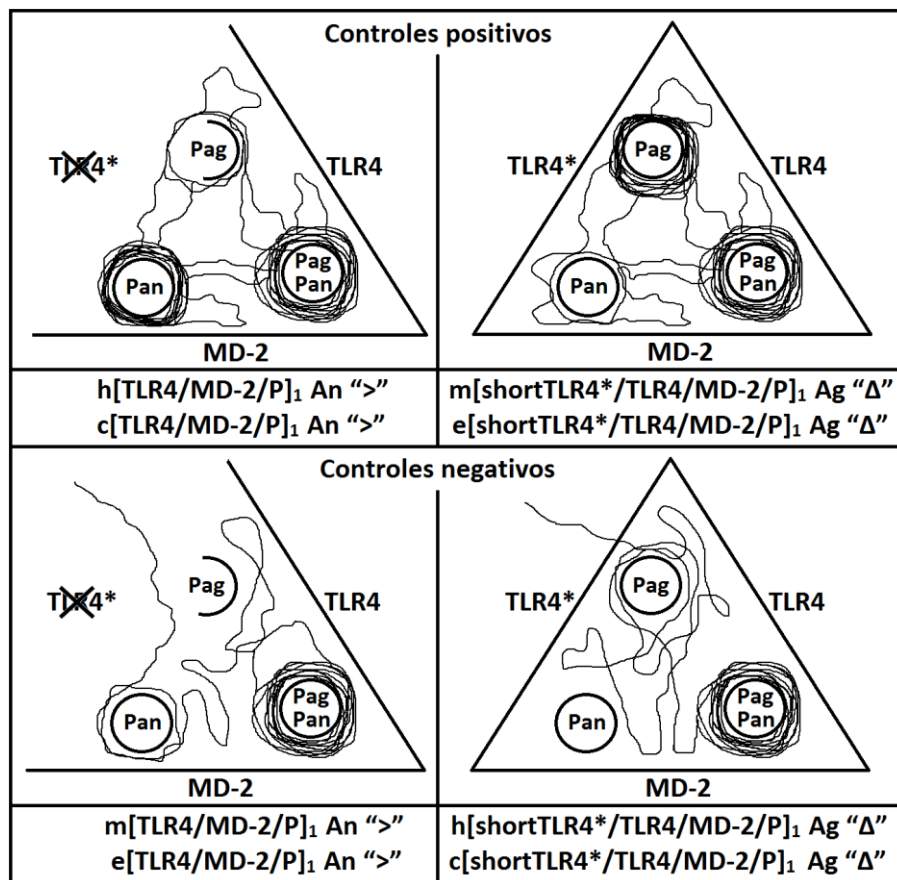


Figura 18. Vista esquemática de las preferencias posicionales esperadas (trayectorias) para las sondas dentro del *Wedge* de forma especie-específica. Estas expectativas están basadas en la **Tabla 5**. El sitio Pag se muestra incompleto en el *Wedge* monomérico (abierto, izquierda) pues su presencia también depende de residuos del TLR4*.

En la **Figura 19** se muestran las preferencias posicionales de los grupos fosfato de forma visual en dos dimensiones dentro del *Wedge*, y en la **Tabla 6** se resumen los residuos de interacción así como los efectos finales simulados, ambos obtenidos por dinámica molecular en complejos diméricos con dos fosfatos en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) como sondas. Cabe señalar que las simulaciones de dinámica molecular se efectúan en un espacio tridimensional imposible de representar en su totalidad por este medio.

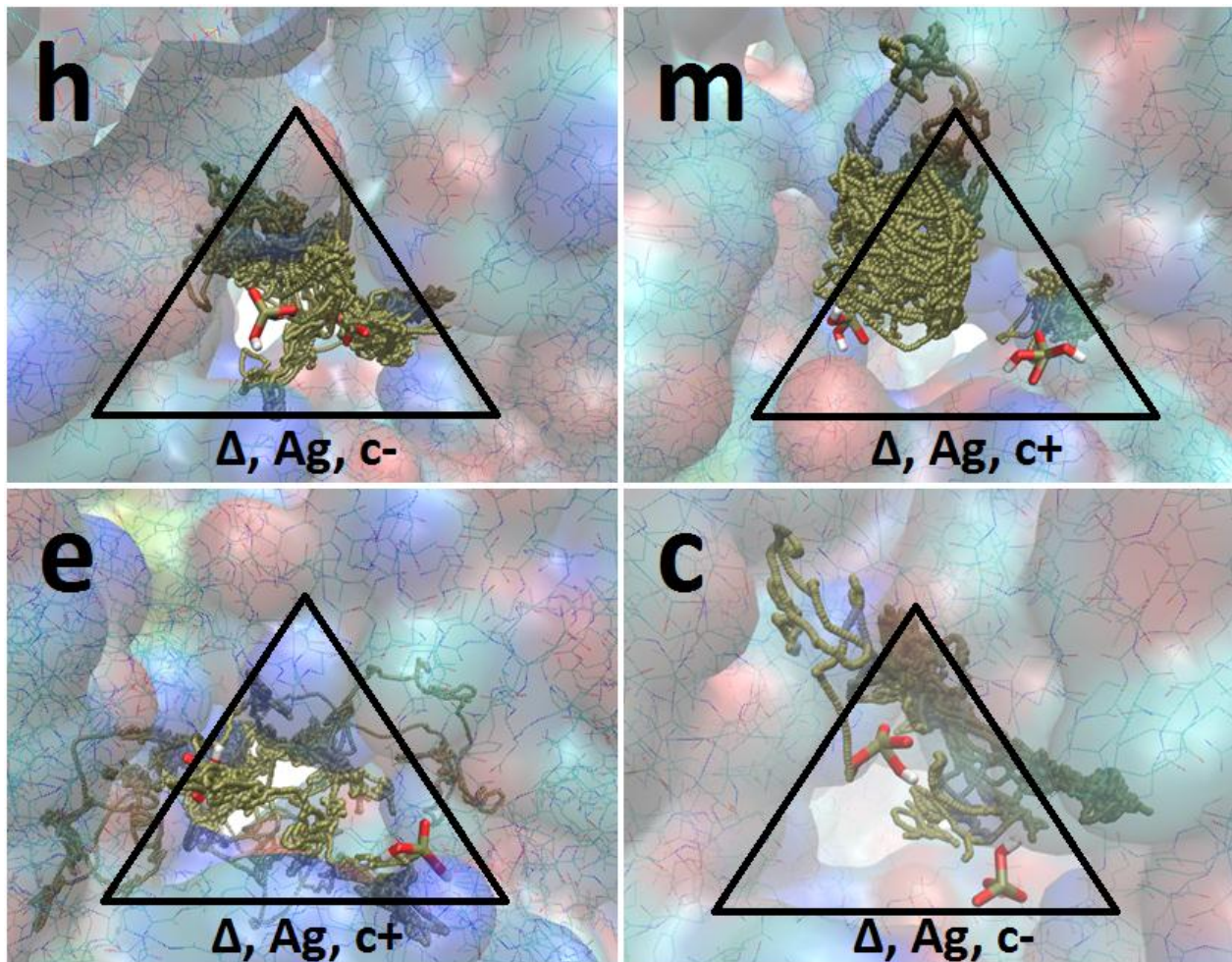


Figura 19. Preferencias posicionales de los grupos fosfato en posición inicial agonista (“Ag”, sitios Pag y PagPan) dentro del *Wedge*; **Izquierda arriba:** *Wedge* humano (control negativo, modelo No. 3); **Derecha arriba:** *Wedge* murino (control positivo, modelo No. 1); **Izquierda abajo:** *Wedge* equino (control positivo, modelo No. 2). **Derecha abajo:** *Wedge* canino (control negativo, modelo No. 4). Los números están en relación al primer bloque de la **Tabla 5**. h: humano, m: murino, e: equino, c: canino Δ: receptor dimérico o [shortTLR4*/TLR4/MD-2], c+: control positivo, c-: control negativo.

Tabla 6. Efectos esperado y simulado (preferencias posicionales) de los dos fosfatos en posición inicial agonista dentro del *Wedge* en el receptor dimérico ([shortTLR4*/TLR4/MD-2]). Los residuos aminoacídicos están numerados con base a la secuencia de la especie equina [32]. Expectativa cumplida (o no) OK (KO). Verde: expectativa cumplida (en función de la 2ª columna). Rojo: Contrario, opuesto o no acorde al efecto esperado. La expresión “no Pan” indica que no se espera que el fosfato muestre preferencia por el sitio Pan.

Especie	Efecto esperado	Efecto simulado	Resultado/Comentarios
Humano (h)	Antagonista Control negativo Dimérico Pag>no Pan PagPan>PagPan	No Antagonista Pag>Pag(Lys341a) Pag>Pag(Lys388b) PagPan>Pag(Lys341a) PagPan>PagPan(Lys362a) PagPan>PagPan(Asn383a)	OK
Murino (m)	Agonista Control positivo Dimérico Pag>Pag PagPan>PagPan	Agonista Pag>Pag(Lys341a) PagPan>PagPan(Lys263a) PagPan>PagPan(Lys360a)	OK
Equino (e)	Agonista Control positivo Dimérico Pag>Pag PagPan>PagPan	Agonista Pag>Pag(Arg385a) PagPan>PagPan(Lys363a)	OK
Canino (c)	Antagonista Control negativo Dimérico Pag>no Pan PagPan>PagPan	No Antagonista Pag>Pag(Lys388b) Pag>Pag(Gly363a) PagPan>Pag(Arg384a) PagPan>PagPan(Lys362a)	OK Interacciones fosfato-fosfato (anión-anión) se observan de forma frecuente.

En la **Figura 19** resulta evidente que en los sistemas humano y canino, las sondas no muestran una preferencia por el sitio Pan, lo cual es entendible pues los residuos de este sitio se encuentran en interacción con residuos del TLR4*. En el caso murino, es claro que hay una preferencia por el sitio Pag y en equino, aunque puede no parecer del todo representativo de un comportamiento esperado (agonista), los grupos fosfato no exploran el sitio Pan. Aunque en todos los casos de la **Figura 19** se intenta representar lo mejor posible el *Wedge*, esto puede resultar complicado pues se trata de una simulación en tres dimensiones. Para evitar confusiones, en la **Tabla 6** (tercera columna) se muestran los residuos con los que interactúa cada fosfato durante la simulación, así como su posición inicial y el o los sitios preferidos por cada fosfato en color. Cada sonda puede moverse a diferentes zonas del *Wedge*, y en ocasiones, pueden interactuar con diferentes residuos a la vez. Cada una de estas interacciones fue observada durante cada simulación, por medio de gráficos de distancia de interacción vs tiempo de simulación (**Figura 20**). Aquellos residuos que

mostraron distancias de interacción de alrededor de 3 Å por periodos de tiempo considerables fueron tomadas en cuenta. Por cuestiones de espacio y para facilitar la lectura de este escrito, los gráficos de distancia de interacción vs tiempo de todas las especies se encuentran en el **Apéndice** (A7). A manera de ejemplo, en la **Figura 20** se muestran algunos de estos gráficos para la especie humana y murina, y para los fosfatos en posición inicial agonista.

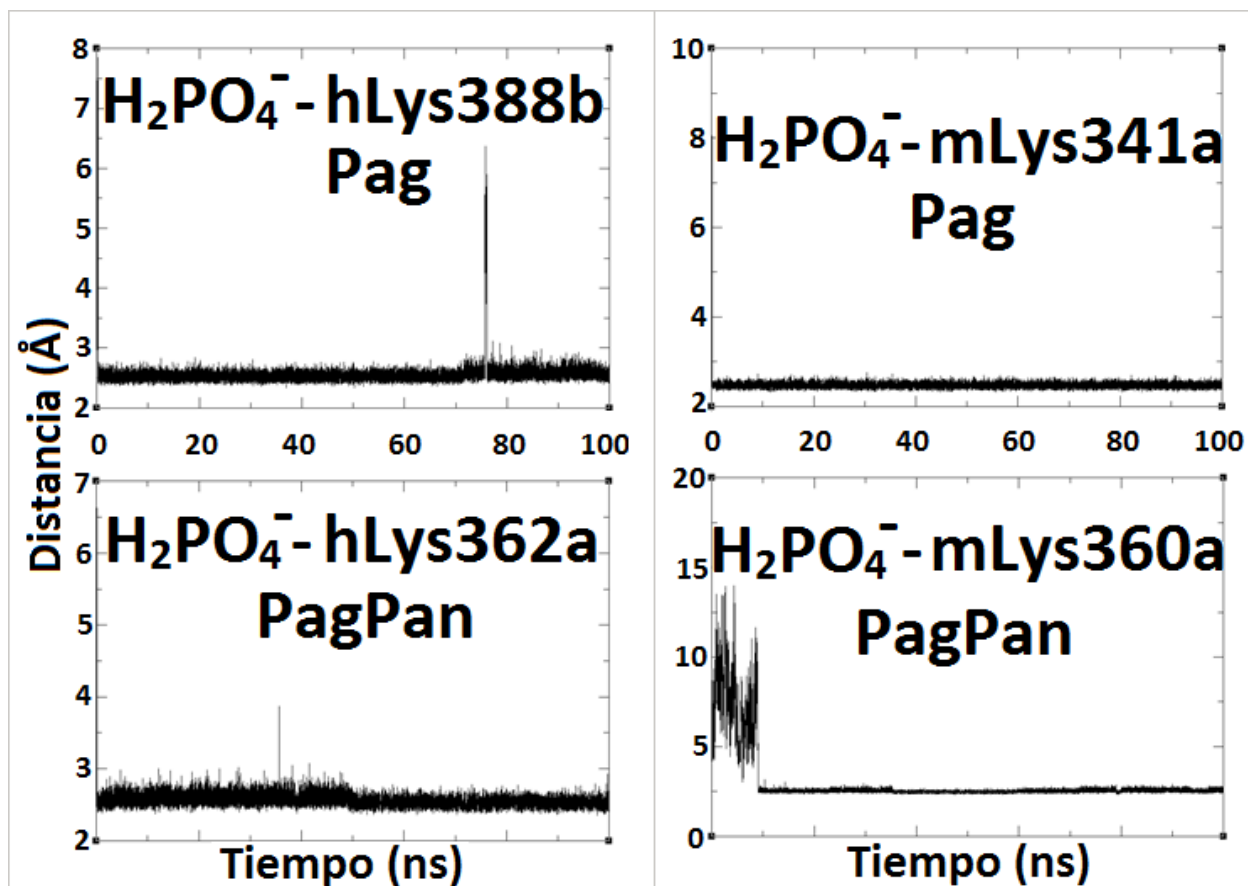


Figura 20. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo de simulación (eje x, ns) entre los grupos fosfato (posición inicial agonista) y los residuos del *Wedge*. **Izquierda:** Las sondas en el *Wedge* dimérico humano (control negativo, receptor dimérico, modelo No. 3, primer bloque de la **Tabla 5**) prefieren u ocupan los sitios Pag y PagPan prácticamente todo el tiempo. **Derecha:** *Wedge* dimérico murino (control positivo, receptor dimérico, modelo No. 1, primer bloque de la **Tabla 5**). Una vez que la sonda interactúa con el residuo de lisina (mLys360a), no prefiere otros sitios. Todos los gráficos de distancias de interacción en función del tiempo para las cuatro especies se encuentran en el **Apéndice** (A7).

En la **Figura 21** se muestran las preferencias posicionales de forma visual en dos dimensiones dentro del *Wedge*, y en la **Tabla 7** se resumen los residuos de interacción así como los efectos

finales simulados, ambos obtenidos por dinámica molecular en complejos monoméricos con dos fosfatos en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) como sondas.

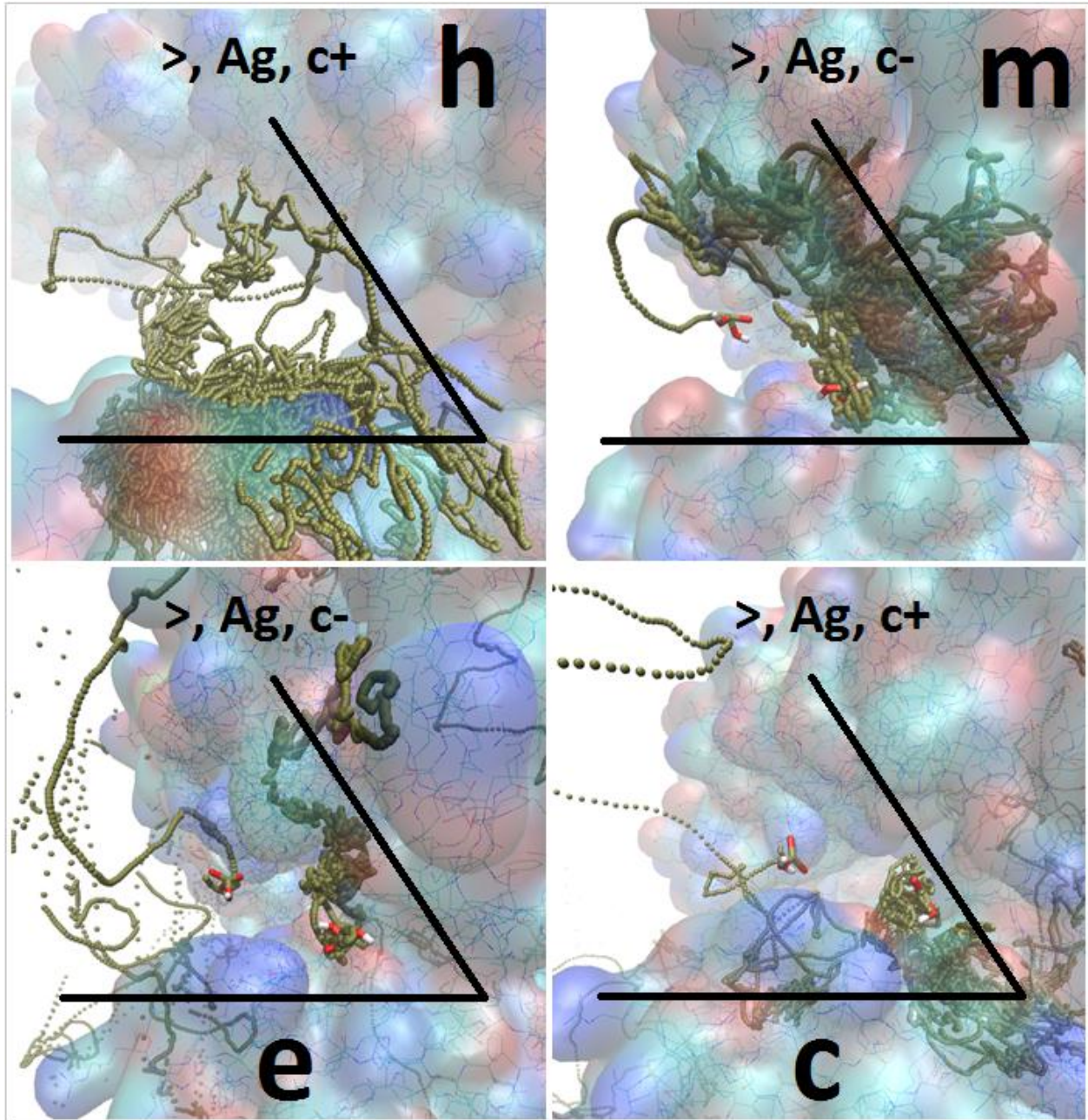


Figura 21. Preferencias posicionales de los grupos fosfato en posición inicial agonista (“Ag”, sitios Pag y PagPan) dentro del *Wedge*; **Izquierda arriba:** *Wedge* humano (control positivo, modelo No. 5); **Derecha arriba:** *Wedge* murino (control negativo, No. 7); **Izquierda abajo:** *Wedge* equino (control negativo, No. 8). **Derecha abajo:** *Wedge* canino (control positivo, modelo No. 6). Los números están en relación al segundo bloque de la **Tabla 5**. h: humano, m: murino, e: equino, c: canino, >: receptor monomérico o [TLR4/MD-2], c+: control positivo, c-: control negativo.

Tabla 7. Efectos esperado y simulado (preferencias posicionales) de los dos fosfatos en posición inicial agonista dentro del *Wedge* en el receptor monomérico ([TLR4/MD-2]). Los residuos aminoacídicos están etiquetados con base a la secuencia de la especie equina [32]. Expectativa cumplida (o no) OK (KO). Verde: expectativa cumplida (en función de la 2ª columna). Rojo: Contrario, opuesto o no acorde al efecto esperado. O: Fuera del *Wedge*. La expresión “no Pag” indica que no se espera que el fosfato muestre preferencia por el sitio Pag.

Especie	Efecto esperado	Efecto simulado	Resultado
Humano (h)	Antagonista Control positivo Monomérico Pag>Pan PagPan>PagPan	Antagonista Pag>Pan(Arg90c) PagPan>Pag(Lys58c) PagPan>Pan(Lys122c)	OK
Murino (m)	Agonista Control negativo Monomérico Pag>no Pag PagPan>PagPan	No Agonista Pag>Pag(Lys341a) Pag>O(Gln339a) Pag>O(Leu340a) PagPan>PagPan(Lys263a) PagPan>PagPan(Lys360a)	OK
Equino (e)	Agonista Control negativo Monomérico Pag>no Pag PagPan>PagPan	No Agonista Pag>O PagPan>PagPan(Lys264a) PagPan>PagPan(Lys363a) PagPan>PagPan(Ser318a)	OK
Canino (c)	Antagonista Control positivo Monomérico Pag>Pan PagPan>PagPan	Antagonista parcial Pag>Pan(Arg90c) Pag>O PagPan>PagPan(Lys264a) PagPan>PagPan(Lys58c)	OK

Como se puede ver en la **Tabla 6** y la **Tabla 7**, y en la **Figura 19** y la **Figura 21** los efectos simulados en estos dos casos están en relación al efecto esperado. Lo anterior podría hacer pensar que el efecto es dependiente de la especie, pero debemos recordar que solo se han simulado las sondas en posiciones iniciales agonista (sitios Pag y PagPan). La decisión inicial de colocar a los fosfatos en posición agonista fue para evitar un sesgo hacía el efecto antagonista, aunque en los resultados presentados existe un sesgo inevitable hacía el efecto agonista, debido a la cercanía con los residuos del sitio Pag. Para solucionar esto y hacer sistemático el estudio, se decidió simular los mismos sistemas pero esta vez partiendo de posiciones iniciales antagonistas (sitios Pan y PagPan). Si las preferencias posicionales resultan iguales o similares a las ya presentadas y esperadas, sería un indicio de un comportamiento especie-específico de los grupos fosfato.

En la **Figura 22** se muestran las preferencias posicionales de forma visual en dos dimensiones dentro del *Wedge*, y en la **Tabla 8** se resumen los residuos de interacción así como los efectos finales simulados, ambos obtenidos mediante dinámica molecular en complejos diméricos con dos fosfatos en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) como sondas.

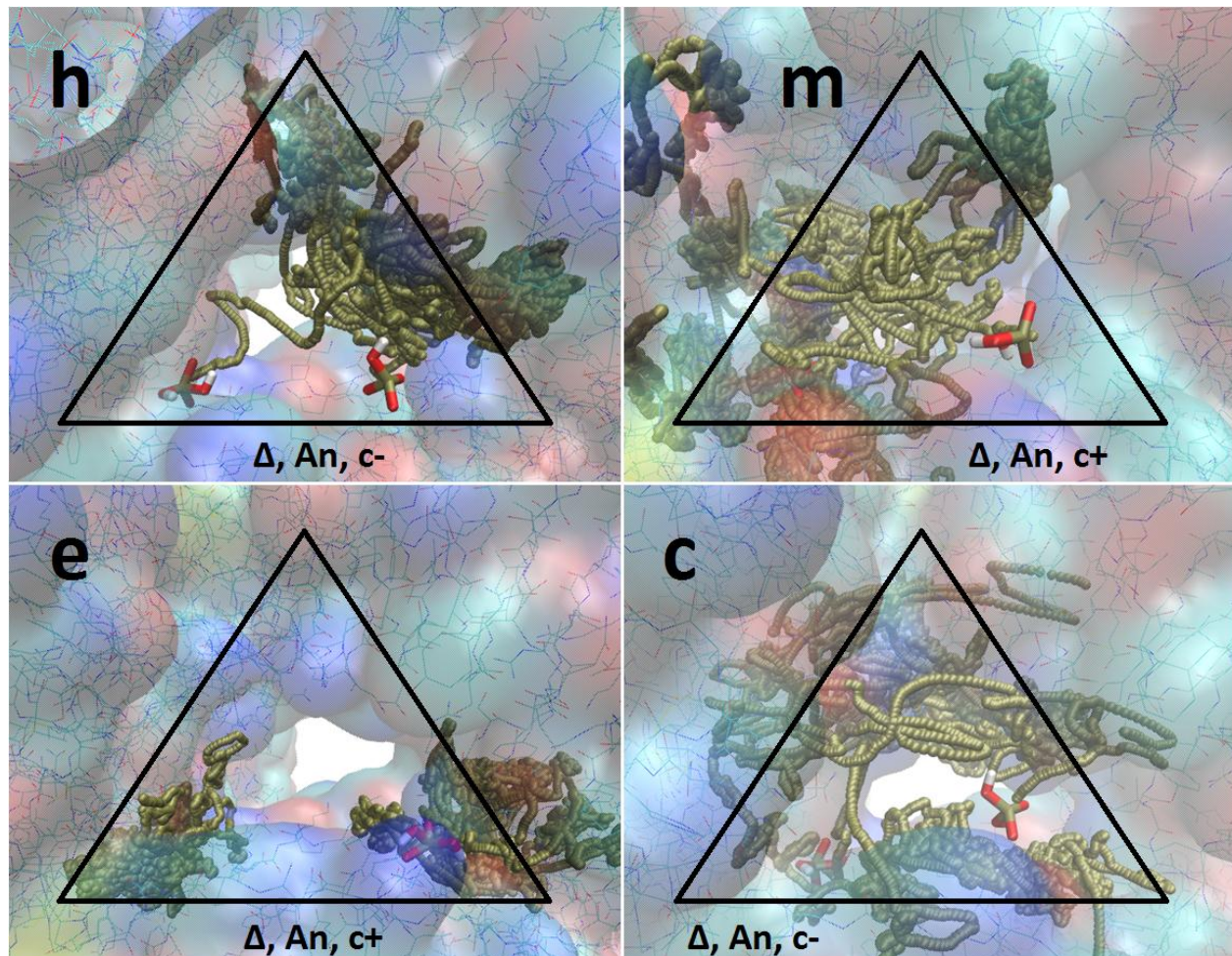


Figura 22. Preferencias posicionales de los grupos fosfato en posición inicial antagonista (“An”, sitios Pan y PagPan) dentro del *Wedge*; **Izquierda arriba:** *Wedge* humano (control negativo, modelo No. 3); **Derecha arriba:** *Wedge* murino (control positivo, modelo No. 1); **Izquierda abajo:** *Wedge* equino (control positivo, modelo No. 2). **Derecha abajo:** *Wedge* canino (control negativo, modelo No. 4). Los números están en relación al primer bloque de la **Tabla 5**. h: humano, m: murino, e: equino, c: canino, Δ : receptor dimérico o [shortTLR4*/TLR4/MD-2], c+: control positivo, c-: control negativo.

Tabla 8. Efectos esperado y simulado (preferencias posicionales) de los dos fosfatos en posición inicial antagonista dentro del *Wedge* en el receptor dimérico ([shortTLR4*/TLR4/MD-2]). Los residuos aminoacídicos están etiquetados con base a la secuencia de la especie equina [32]. Expectativa cumplida (o no) OK (KO). Verde: expectativa cumplida (en función de la 2ª columna). Rojo: Contrario, opuesto o no acorde al efecto esperado. O: Fuera del *Wedge*. La expresión “no Pan” indica que no se espera que el fosfato muestre preferencia por el sitio Pan.

Especie	Efecto esperado	Efecto simulado	Resultado/Comentarios
Humano (h)	Antagonista Control negativo Dimérico Pan>no Pan PagPan>PagPan	No Antagonista Pan>Pag(Lys341a) PagPan>PagPan(Lys362a) PagPan>Pag(Lys388b)	OK
Murino (m)	Agonista Control positivo Dimérico Pan>Pag PagPan>PagPan	Agonist Pan>O(Arg380a) Pan>O(Arg434b) PagPan>PagPan(Lys360a) PagPan>O(Gln339a)	KO El residuo Arg380a no forma parte del <i>Wedge</i> .
Equino (e)	Agonista Control positivo Dimérico Pan>Pag PagPan>PagPan	No Agonista Pan>O(Arg122c) Pan>O(Phe441b) PagPan>PagPan(Lys264a)	KO El residuo Phe441b no forma parte del <i>Wedge</i> .
Canino (c)	Antagonista Control negativo Dimérico Pan>no Pan PagPan>PagPan	No Antagonista Pan>Pag(Arg58c) Pan>Pag(Arg122c) Pan>PagPan(Lys264a) PagPan>PagPan(Lys362a)	OK El fosfato en posición inicial Pan salió del <i>Wedge</i> la mayor parte del tiempo.

De la **Figura 22** y la **Tabla 8** resulta claro que los controles positivos (murino y equino) no cumplieron con la expectativa, lo cual habla de un efecto no dependiente de la especie. En ambas especies se espera que los fosfatos se coloquen en sitios específicos de acuerdo a las estructuras cristalográficas observadas (sitio Pag), situación que no ocurre. El éxito en los controles negativos en este caso (humano y canino), no resulta crucial, pues únicamente se espera que no tomen la posición señalada en la **Tabla 8**, por lo que su comportamiento puede ser azaroso. Sin embargo, lo anterior no es indicativo contundente de que el efecto no es especie-especifico, se tiene que observar que sucede en receptores monoméricos. Así, en la **Figura 23** se muestran las preferencias posicionales de forma visual en dos dimensiones dentro del *Wedge*, y en la **Tabla 9** se resumen los residuos de interacción así como los efectos finales simulados, ambos obtenidos

por dinámica molecular en complejos monoméricos con dos fosfatos en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) como sondas.

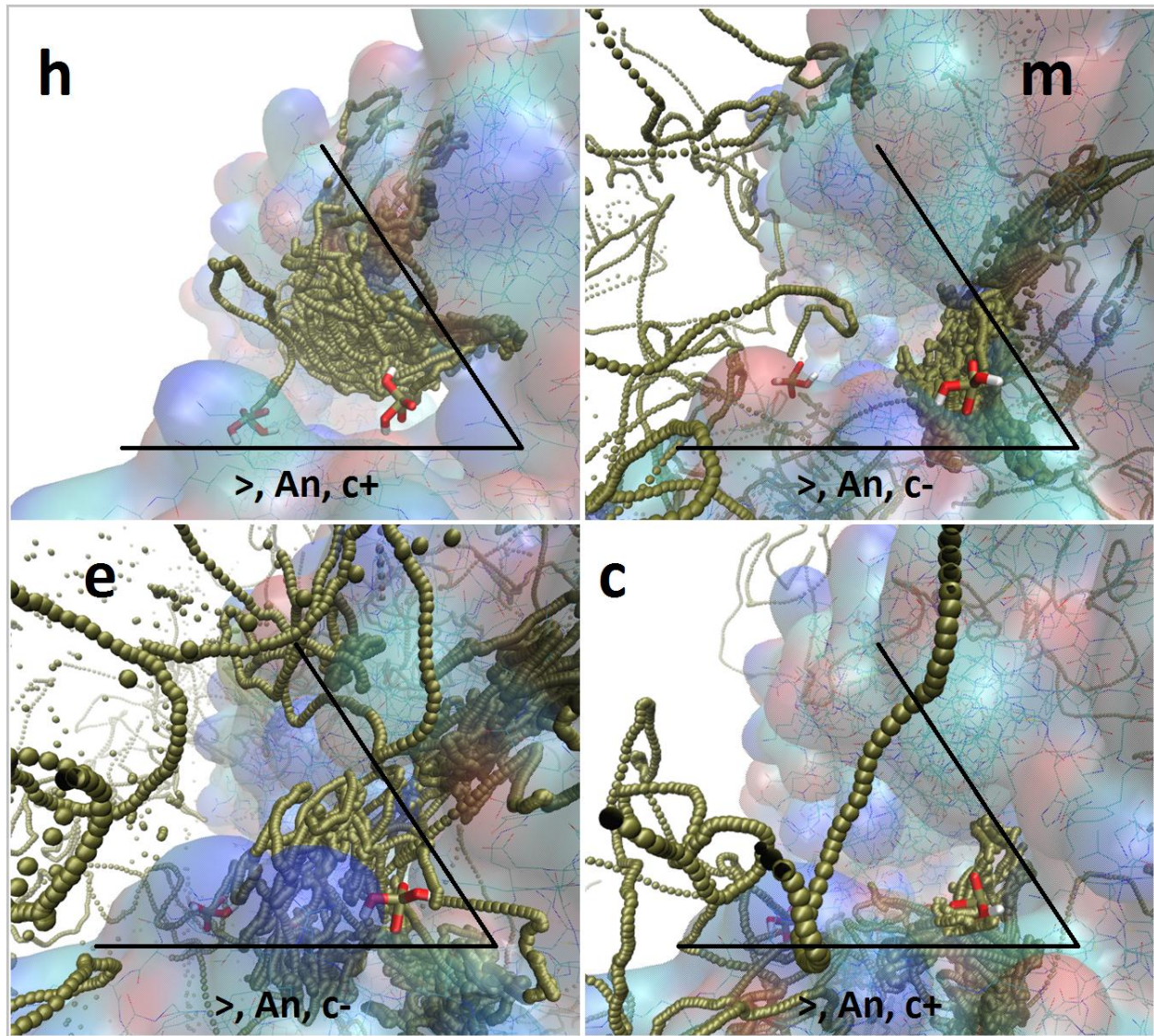


Figura 23. Preferencias posicionales de los grupos fosfato en posición inicial antagonista (“An”, sitios Pan y PagPan) dentro del *Wedge*; **Izquierda arriba:** *Wedge* humano (control positivo, modelo No. 5); **Derecha arriba:** *Wedge* murino (control negativo, No. 7); **Izquierda abajo:** *Wedge* equino (control negativo, No. 8). **Derecha abajo:** *Wedge* canino (control positivo, modelo No. 6). Los números están en relación al segundo bloque de la **Tabla 5**. h: humano, m: murino, e: equino, c: canino, >: receptor monomérico o [TLR4/MD-2], c+: control positivo, c-: control negativo

Tabla 9. Efectos esperado y simulado (preferencias posicionales) de los dos fosfatos en posición inicial antagonista dentro del *Wedge* en el receptor monomérico ([TLR4/MD-2]). Los residuos aminoacídicos están etiquetados en base a la secuencia de la especie equina [32]. Expectativa cumplida (o no) OK (KO). Verde: expectativa cumplida (en función de la 2ª columna). Rojo: Contrario, opuesto o no acorde al efecto esperado. O: Fuera del *Wedge*. La expresión “no Pag” indica que no se espera que el fosfato muestre preferencia por el sitio Pag.

Especie	Efecto esperado	Efecto simulado	Resultado/Comentarios
Humano (h)	Antagonista Control positivo Monomérico Pan>Pan PagPan>PagPan	No Antagonista Pan>Pag(Arg382a) Pan>PagPan(Lys362a) PagPan>PagPan(Lys341a)	KO El fosfato colocado en posición inicial Pan interactúa con el residuo Arg382a que no pertenece al <i>Wedge</i> . Cuando el fosfato (Pan) interactúa con Lys362a, se sitúa en una posición intermedia entre los sitios Pag y PagPan. El residuo Lys341a puede desplazarse casi hasta el sitio PagPan.
Murino (m)	Agonista Control negativo Monomérico Pan>no Pag PagPan>PagPan	No Agonista No Antagonista Pan>O PagPan>PagPan(Lys263a) PagPan>PagPan(Asn58c) PagPan>PagPan(Tyr291a)	OK El fosfato colocado en posición inicial PagPan interactúa con los residuos Asn58c y Tyr291a mientras interactúa fuertemente con Lys263a en una posición intermedia entre los sitios Pag y PagPan. El residuo de tirosina parece estabilizar la interacción. Aunque la interacción parece débil se presenta de manera frecuente.
Equino (e)	Agonista Control negativo Monomérico Pan>no Pag PagPan>PagPan	No Agonista No Antagonista Pan>O PagPan>PagPan(Lys264a) PagPan>PagPan(Asp294a)	OK El residuo Asp294a no forma parte del <i>Wedge</i> .
Canino (c)	Antagonista Control positivo Monomérico Pan>Pan PagPan>PagPan	No Antagonista Pan>O PagPan>PagPan(Lys264a) PagPan>PagPan(Lys58c)	KO Al inicio de la simulación, el fosfato colocado en posición inicial PagPan interactúa fuertemente con Lys264a y después con Lys58c también. Hacia el final de la simulación, el mismo fosfato interactúa únicamente con Lys58c debajo del sitio Pag, pero siempre en las proximidades del sitio PagPan.

Tanto de la **Figura 23** como de la **Tabla 9**, y de los resultados mostrados hasta este punto, se puede concluir que la preferencia de los grupos fosfato no es dependiente de la especie como se supuso inicialmente. De serlo, las preferencias posicionales habrían resultado iguales o similares a las encontradas cuando se evaluaron las sondas en posición agonista. La discrepancia más notable se da al comparar los resultados de los controles positivos en ambos casos (posiciones iniciales agonista y antagonista), los cuales no coinciden.

Para complementar el estudio, se analizaron las características del *Wedge* por medio de mapas de potenciales de interacción de la sonda y del análisis de las propiedades electrostáticas de la interfaz.

Mapas de potencial de interacción de los grupos fosfato dentro del *Wedge*

Además de los cálculos mediante dinámica molecular se calcularon también mapas de potencial de interacción (IAP) de los grupos fosfato para el L4a como agonista y antagonista en las cuatro especies, y permitir la evaluación de una sonda hidrofóbica y una hidrofílica (**Figura IAP-L4a**).

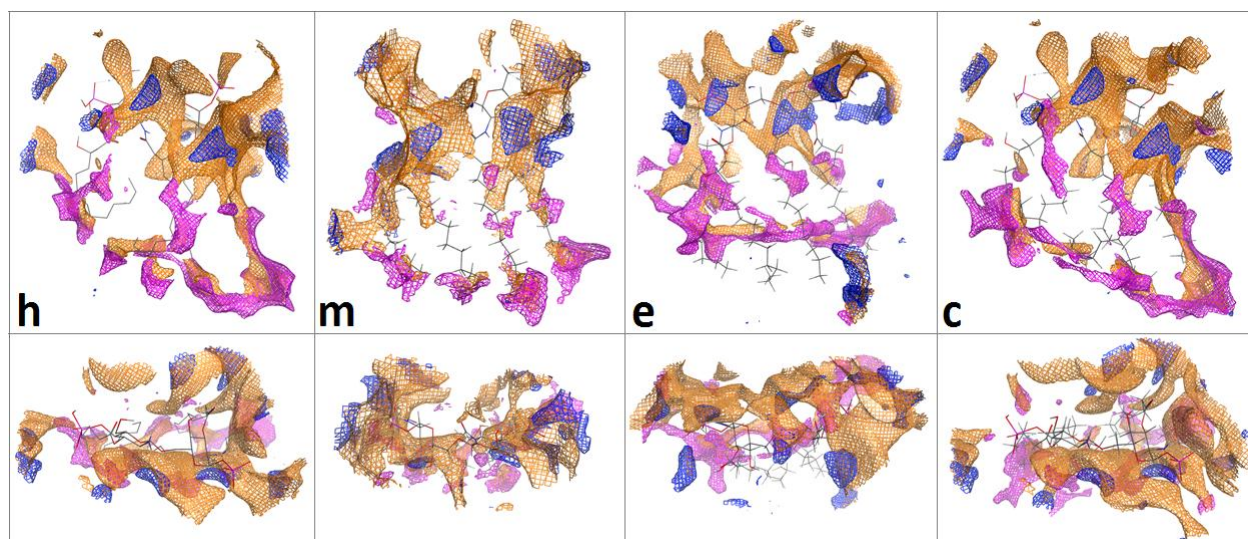


Figura 24. Mapas de potencial de interacción generados al rededor del L4a dentro del *Wedge* para humano (h), murino (m), equino (e) y canino (c). En las imágenes de la fila superior, para las especies murina y equina, el fosfato 2 (L4a-P2) está posicionado al lado derecho (sitio PagPan), contrario a las especies human y canina, donde el mismo fosfato se encuentra al lado izquierdo, cubierto en su mayoría por los mapas proyectados. En la fila inferior se muestra una vista superior en cada caso. Naranja: Mapa IAP del fosfato; magenta: zonas hidrofóbicas; azul: zonas hidrofílicas. P2 denota el grupo fosfato en la glucosamina II (GlcN II) del *scaffold* de L4a [8,32].

Los mapas IAP mostrados en la **Figura 24** resultan similares en cuanto a la actividad reportada, es decir, el potencial de interacción de los grupos fosfato con residuos del *Wedge* de las especies humana y canina es similar y se han reportado como antagonistas, contrario a lo reportado en murino y equino (agonistas), los cuales también comparten semejanzas aunque en menor grado. Además de lo anterior, en algo que no corresponde a los objetivos de este estudio, se observa un alto potencial de las cadenas acilo (color morado, **Figura 24**) principalmente en humano y perro.

No se profundizará más en esta discusión, pero este dato podría resultar crucial en la interacción del L4a.

Regresando al análisis del grupo fosfato, los mapas IAP mostrados en la **Figura 24** no son un fiel reflejo de su potencial de interacción dentro del *Wedge*, ya que se han proyectado sobre la superficie del ligando por lo que reflejan el potencial de interacción de los fosfatos en torno al L4a, lo cual no es objetivo de este trabajo. Por lo anterior, se calcularon nuevos mapas IAP para las cuatro especies en los *Wedges* de receptores diméricos y monoméricos, pero esta vez sondeando al fosfato únicamente. Estos nuevos mapas son un reflejo certero de la preferencia posicional del fosfato pues se hace con referencia a los residuos del *Wedge* y sin presencia de ligando. Los mapas IAP del *Wedge*, fueron además generados sobre la superficie de *Van der Waals* incluyendo las propiedades electrostáticas del *Wedge*, lo cual se comentará más adelante, pues en este caso se hizo únicamente con fines de obtener una visualización clara.

En la **Figura 25** y la **Figura 26** se muestran los mapas IAPS generados en *Wedges* diméricos y monoméricos para las cuatro especies.

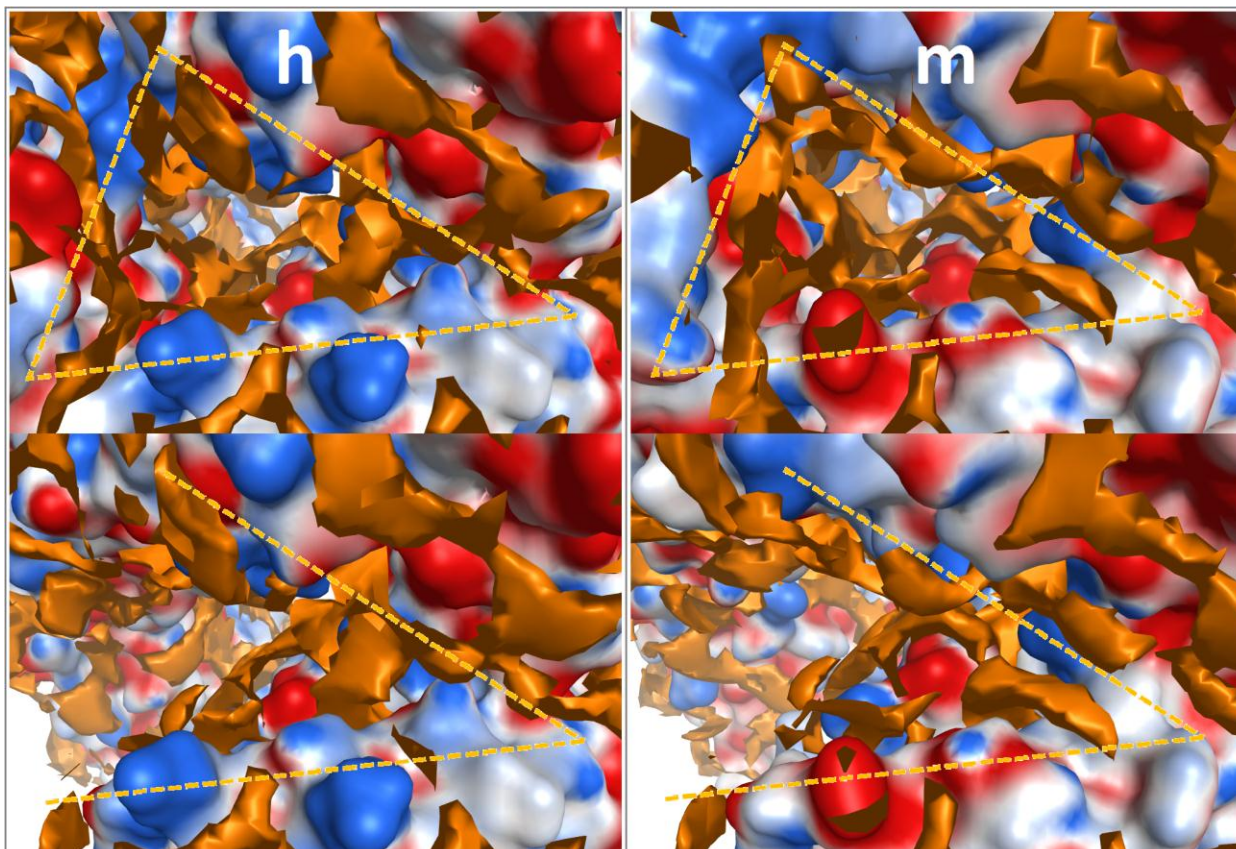


Figura 25. Mapas de potencial de interacción de la sonda fosfato dentro del *Wedge* para las especies humana (h) y murina (m). El mapa IAP (naranja) está desplegado sobre las propiedades electrostáticas del complejo receptor (rojo: aniónico/ácido; azul: catiónico/básico; blanco: no-polar/hidrofóbico). En la fila superior, se muestra el complejo receptor dimérico ($[TLR4/MD-2]_2$). En la fila inferior, se muestra el complejo receptor monomérico ($[TLR4/MD-2]_1$) [8,32].

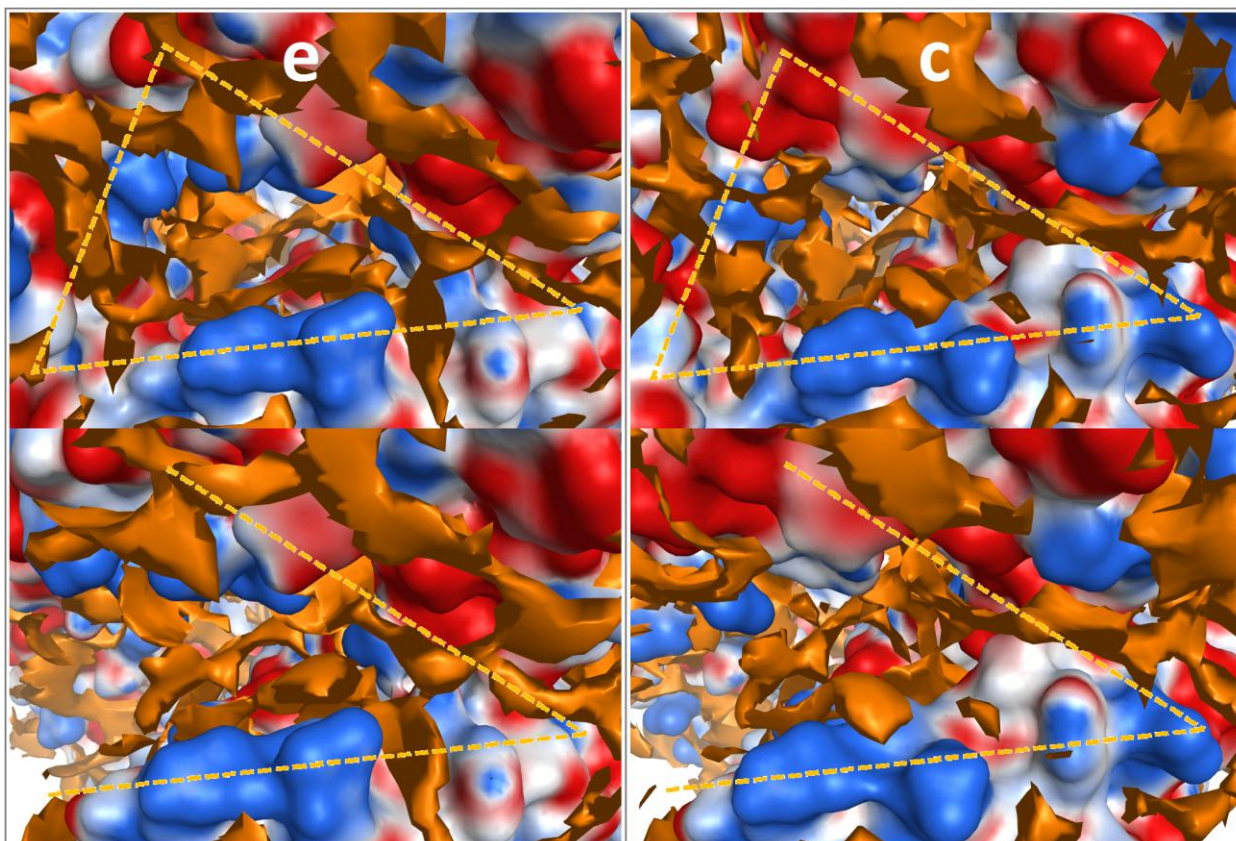


Figura 26. Mapas de potencial de interacción de la sonda fosfato dentro del *Wedge* para las especies equina (e) y canina (c). El mapa IAP (naranja) está desplegado sobre las propiedades electrostáticas del complejo receptor (rojo: aniónico/ácido; azul: catiónico/básico; blanco: no-polar/hidrofóbico). En la fila superior, se muestra el complejo receptor dimérico ($[TLR4/MD-2]_2$). En la fila inferior, se muestra el complejo receptor monomérico ($[TLR4/MD-2]_1$).

Mientras que los mapas IAP humano, equino y canino pueden ser clasificados en un grupo, el mapa IAP murino se distingue de los demás al poseer un sitio Pag catiónico y un sitio Pan aniónico. Los otros tres tienen sitio Pag mixtos y un sitio Pan catiónico para cualquier ligando similar al LPS. De los tres, el *Wedge* canino es el que presenta el mayor carácter ácido en el sitio Pag. Estos hallazgos corroboran el estudio de la preferencia posicional de los grupos fosfato por MD para las cuatro especies. Solo el *Wedge* murino tiene una complementariedad ideal en el sitio Pag donde todas las cadenas laterales circundantes son catiónicas para acomodar su grupo fosfato.

Análisis de las propiedades electrostáticas del *Wedge*

Las tres figuras a continuación (**Figura 27**, **Figura 28** y **Figura 29**) explican porque el fosfato en el esqueleto diglucosamino se une en posición agonista o antagonista por medio del despliegue de las propiedades electrostáticas de las cadenas laterales de los residuos del *Wedge* para humano y ratón. Con el fin de visualizar cualquier posible interacción repulsiva del hTLR4* (antagonista), este fue artificialmente adicionado al monómero [TLR4/MD-2] (líneas punteadas en **Figura 27** y **Figura 28**). Cuando se compara con el *Wedge* murino, se hace evidente a simple vista que este último forma un *Wedge* más estable por atracción de cargas opuestas (véanse superficies de color azul y rojo en la **Figura 29**).

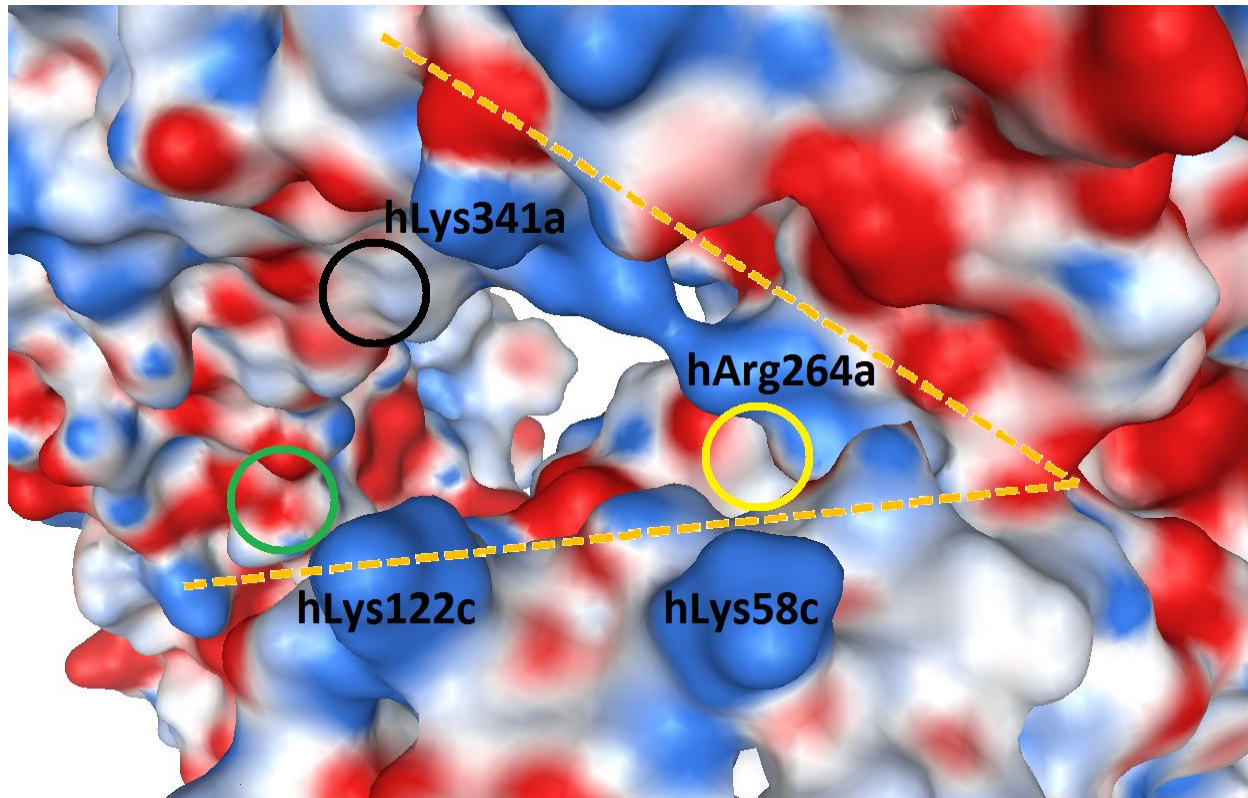


Figura 27. Vista de la superficie del *Wedge* natural humano (observado por rayos-X con L4a, razonable) sin el TLR4*. La superficie de las cadenas laterales de los residuos están coloreados en función de las propiedades electrostáticas (rojo: aniónico/ácido; azul: catiónico/básico; blanco: no-polar/hidrofóbico). En interacción con el L4a hipo-acilado, los grupos fosfato interactúan con los residuos catiónicos hArg264a y hLys122c para ocupar los sitios PagPan (círculo amarillo) y Pan (círculo verde), dejando el sitio Pag (círculo negro) desocupado. Este modelo se relaciona adecuadamente con la actividad antagonista reportada [8,32] o estructuras cristalizadas observadas (código PDB 2E56 [26]).

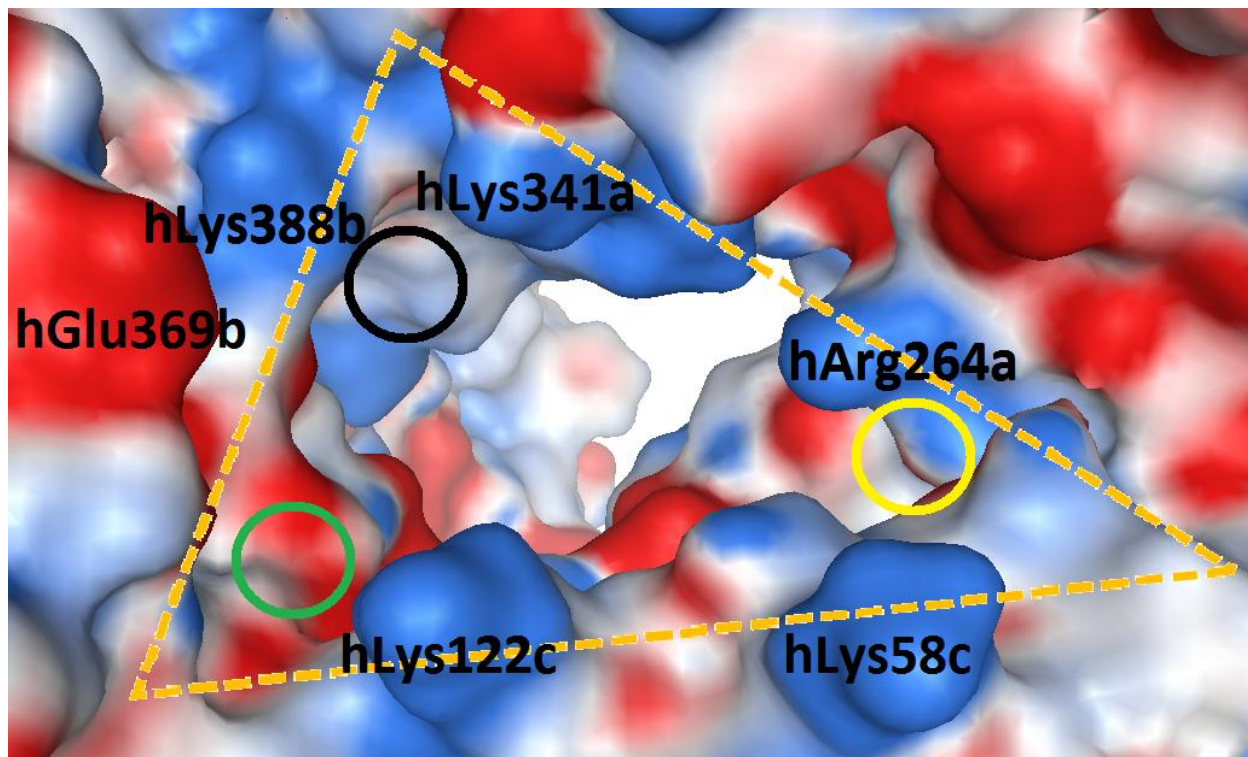


Figura 28. Vista de la superficie del *Wedge* artificial humano (no observado por rayos-X con L4a, no razonable) con el TLR4*. La superficie de las cadenas laterales de los residuos están coloreados en función de las propiedades electrostáticas (rojo: aniónico/ácido; azul: catiónico/básico; blanco: no-polar/hidrofóbico). En interacción con el LA hexa-acilado o LPS, los grupos fosfato interactúan con los residuos catiónicos hArg264a y hLys388b para ocupar los sitios PagPan (círculo amarillo) y Pag (círculo negro), dejando el sitio Pan (círculo verde) desocupado. Este modelo se relaciona adecuadamente con la actividad agonista reportada [8,32] o estructuras cristalizadas observadas (código PDB 3FXI [14]).

El TLR4 contrario (TLR4*) fue colocado dentro del *Wedge* como control negativo en humano. De esta forma, es evidente la repulsión entre hLys341a and hLys388b. Además los residuos hArg90c (no se muestra debido a la perspectiva de la imagen) y hLys122c interactúan favorablemente con el fosfato de un ligando antagonista y de forma no favorable con hGlu439b, todo lo cual contribuye a la repulsión del TLR4* (compárese **Figura 27** con **Figura 28**).

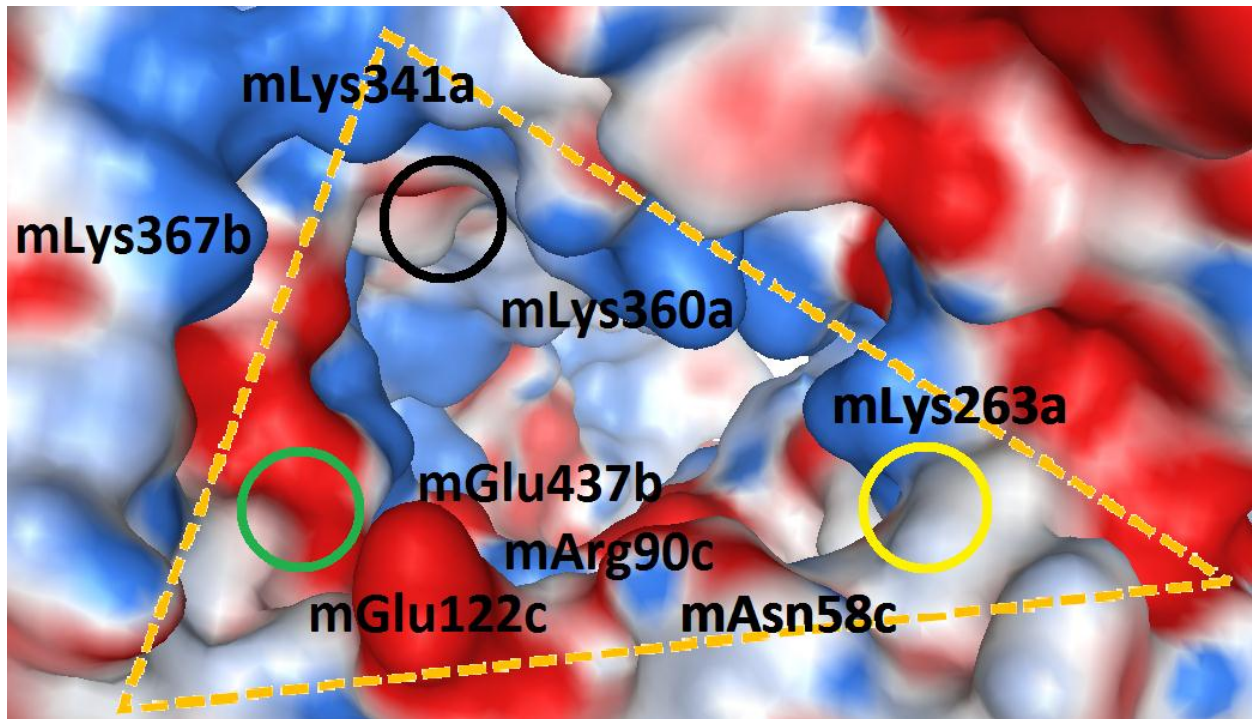


Figura 29. Vista de la superficie del *Wedge* natural murino (observado por rayos-X con L4a, razonable) con el TLR4*. La superficie de las cadenas laterales de los residuos están coloreados en función de las propiedades electrostáticas (rojo: aniónico/ácido; azul: catiónico/básico; blanco: no-polar/hidrofóbico). En interacción con el L4a hipo-acilado, del LA hexa-acilado o LPS, los grupos fosfato interactúan con los residuos catiónicos mArg263a y el residuo mLys367b del TLR4* asistido por mLys341a y mLys360a del TLR4 ocupando los sitios PagPan (círculo amarillo) y Pag (círculo negro), dejando el sitio Pan (círculo verde) desocupado. Este modelo se relaciona adecuadamente con la actividad agonista reportada [8,32] o estructuras cristalizadas observadas (código PDB 3VQ1 [7]).

En la **Figura 27**, **Figura 28** y **Figura 29**, se puede observar tres principales diferencias. Una región del MD-2 (parte inferior de cada imagen, hLys122c y hLys58c o mGlu122c y mAsn58c) muestra prácticamente características opuestas. Otra diferencia crítica se observa en el TLR4* (lado izquierdo de cada imagen, hGlu369b y mLys367b). Finalmente, en la parte superior de las tres figuras el TLR4 está presente, las características electrostáticas en esta zona son similares, pero en ratón mLys341a, mLys360a y mLys319a están más expuestos que sus residuos homólogos en humano para formar interacciones con los fosfatos. Estos hallazgos explican porque L4a puede comportarse como agonista. Al comparar la **Figura 28** con la **Figura 29**, se observa que el *Wedge* humano es más grande que el murino. Es decir, en humano los residuos para formar interacciones con sitio Pag se encuentran más lejos en relación al *Wedge* murino.

Al inspeccionar el *Wedge*, resulta evidente que un fosfato de LPS o sus derivados siempre se coloca en el sitio PagPan, por lo que la actividad agonista/antagonista está relacionada con la posición del otro grupo fosfato. Para establecer una posible dependencia de la posición de la carga, se determinó la carga neta de los sitios Pag y Pan (**Tabla 10**). Lo anterior con la finalidad de encontrar diferencia en las cargas totales entre las cuatro especies.

Como se observa en la **Tabla 10**, el TLR4 tiene presencia en el sitio Pag, pero no contacta con el sitio Pan. Algo similar ocurre con el MD-2, el cual presenta interacciones con el sitio Pan, pero no tiene acceso al sitio Pag. LA única subunidad que contacta con ambos sitios es el TLR4* en la interfaz de dimerización. Los sitios PagPan de las cuatro especies muestran la misma carga total (+2), tratándose siempre de residuos de lisina (hLys362a, mLys263a, mLys360a, eLys264a, eLys363a, cLys264a, cLys362a) o arginina (hArg264a).

Mientras que el sitio Pan puede estar formado únicamente por residuos del MD-2 (hLys58c, hArg90c, mAsn58c, mArg90c, eArg58c, eArg90c, cLys58c, cArg90c), el sitio Pag depende también de la participación de residuos del TLR4* (hLys388b, hGln436b, mSer386b, mArg434b, eLys389b, eGln437b, cLys388b, cGln436b). La cadena c (MD-2) está muy lejos del sitio Pag, por lo que no puede contribuir con las cadenas laterales de sus residuos.

Por lo tanto, un análisis sistemático de las cargas fue llevado a cabo en las interfaces TLR4*/TLR4 y TLR4*/MD-2.

Tabla 10. Contribuciones diferenciales de carga neta en los sitios Pag y Pan para las cuatro especies de los residuos en el *Wedge* monomérico (“>”) o dimérico (“Δ”). En la última columna: (a), (a,b), (c) o (b,c) indica(n) la(s) cadena(s) a la(s) que pertenece la carga.

Especies	a (TLR4)		b (TLR4*)		c (MD-2)		Balance total	
	Pag	Pan	Pag	Pan	Pag	Pan	Pag	Pan
h	+1 Lys362a +1 Lys341a	---	-1 Glu369b +1 Lys388b +1 Arg435b	-1 Glu439b	---	+1 Arg90c +1 Lys122c	+2 a > +3 a,b Δ	+1 c > +1 b,c Δ
m	+1 Lys360a +1 Lys341a	---	+1 Lys367b +1 Lys433b +1 Arg434b	-1 Glu437b	---	+1 Arg90c -1 Glu122c	+2 a > +5 a,b Δ	-1 c > -1 b,c Δ
e	+1 Lys363a +1 Arg342a +1 Arg385a	---	-1 Glu370b +1 Lys389b +1 Lys436b	-1 Asp440b	---	+1 Arg90c +1 Arg122c	+3 a > +4 a,b Δ	+1 c > +1 b,c Δ
c	+1 Lys363a +1 Arg385a	---	-1 Asp369b +1 Lys389b +1 Lys436b	-1 Asp439b	---	+1 Arg90c +1 Arg122c	+2 a > +3 a,b Δ	+1 c > +1 b,c Δ

Estos resultados sobre la carga neta de los sitios Pag, Pan y PagPan reflejan la atracción total de los grupos fosfato monoaniónicos. Además, el balance total indica que las diferencias entre especies deben estar guiadas por otros factores (acilaciones, volumen del *Wedge*).

Ciertos residuos catiónicos fueron tomados en cuenta debido a que sus cadenas laterales pueden formar interacciones en el sitio Pag (hLys435b, hThr413b, mLys433b, mLle411b, eSer414b, eLys436b, cLys436b, cThr414b, **Tabla 10** y **Figura 30**). Estos residuos no fueron parte del primer mapeo presentado [32], pero en este análisis por simulaciones MD y en una revisión exhaustiva, se observó que pueden formar parte del sitio Pag. Cabe mencionar que no sólo los residuos reportados se tomaron en cuenta para este estudio, sino que se consideraron todos aquellos con posibilidades de formar interacciones en alguno de los sitios establecidos en el *Wedge*. Es notable que la especie murina presenta la mayor carga neta en el sitio Pag, lo que deriva en una fuerte atracción de uno de los fosfato hacia este sitio, lo que explica que ligandos como el L4a presenten efecto agonista en esta especie. Las cargas calculadas para las especies humana, equina y canina resultan muy similares en los sitios Pag y Pan, y concuerda con lo observado con los mapas IAP y la proyección de las propiedades electrostáticas del *Wedge*.

Adecuaciones al *Wedge* reportado

Dos nuevos aminoácidos fueron agregados al modelo existente del *Wedge* (residuos subrayados, **Figura 30**). Este modelo modificado intenta reflejar la posición relativa de cada residuo dentro del *Wedge*. El *Wedge* de la especie canina se presenta por primera vez.

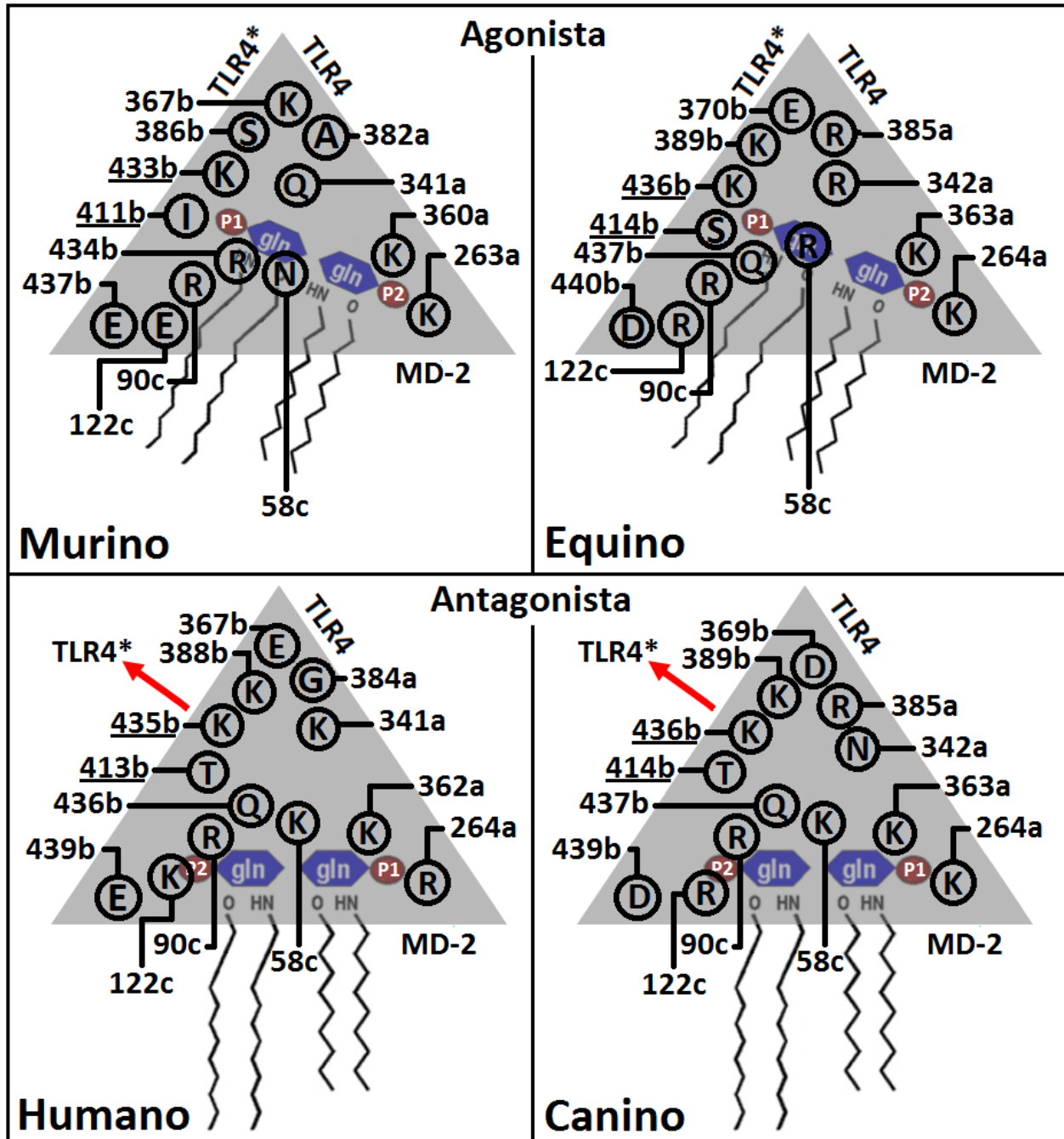


Figura 30. Adecuaciones al *Wedge* de las especies humana, canina, equina, y murina. Se presentan los residuos que interactúan con la sonda fosfato. Los residuos agregados están subrayados.

Las cadenas laterales de los dos nuevos residuos presentados en la figura **Figura 30**, mostraron presencia dentro del *Wedge*. Estos, favorecen la preferencia del fosfato cuando se coloca en posición Pag. Las cadenas laterales de los residuos hLys435b, mLys433b, eLys436b y cLys436b se ubican muy cerca de este sitio, lo que fortalece la interacción en ligandos agonistas. Los residuos de treonina y serina mostraron interacciones recurrentes que parecen estabilizar las interacciones con estas lisinas, o incluso con otras. Un residuo de isoleucina en ratón (mIle411b) no aporta interacciones electrostáticas en el sitio Pag, pero puede contribuir con su volumen para favorecer la posición agonista de ligandos tales como el L4a.

Acoplamiento molecular automático del lípido A con la proteína de unión a Lipopolisacárido

A diferencia de la evaluación posicional del grupo fosfato, en este caso únicamente se analiza la interacción del LA (parte activa del LPS) con la proteína de unión a LPS murina también llamada LBP (código PDB 4M4D [47]). Se conoce el sitio de unión del LA en la LBP indirectamente por experimentos de titulación tipo ELISA semi-cuantitativos [47]. Sin embargo, no se conocen detalles a nivel atómico por cristalografía de rayos-X. Por lo tanto, esta situación permite investigar teóricamente lo que no se ha podido observar experimentalmente de forma directa, es decir, se generó un complejo modelado proteína-ligando. Este es uno de los casos en los que el modelado no es complementario al experimento, sino que el modelo es el único accesible a ofrecer evidencia teórica de la interacción. Se realizó un acoplamiento molecular automático que ubica posibles sitios de unión en el receptor. La proteína fue cristalizada con una molécula de fosfatidilcolina (FC), que si bien presenta una parte lipídica y una polar de la misma forma que el LA, difieren significativamente en relación al tamaño. Los resultados de los acoplamientos automáticos realizados se muestran en la **Figura 31**.

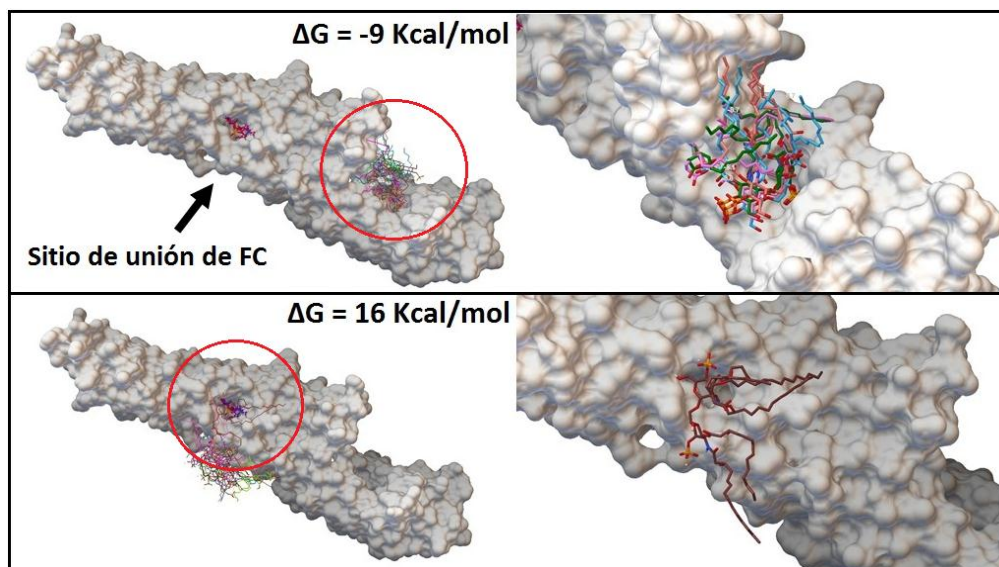


Figura 31. Acoplamiento molecular automático entre el LA y la proteína de unión a LPS (LBP). En la parte superior se observa el sitio de unión del LA en la LBP. En la parte inferior se muestra las diferentes conformaciones de LA en torno al sitio de unión de la FC cristalizada dentro de la LBP. FC: fosfatidilcolina.

El acoplamiento molecular del LA con la LBP se realizó para verificar si el sitio de unión era el mismo de la FC (**Figura 31**). Dada la gran diferencia de tamaño entre ambas moléculas, era de suponerse que no compartían el mismo sitio de unión, lo cual se confirmó. Todas las conformaciones obtenidas se ubican en una gran cavidad en un extremo de la LBP (parte superior, **Figura 31**), siendo en apariencia complementarias a este posible sitio de unión y con una alta energía libre de interacción ($\Delta G_{\text{binding}} = -9 \text{ Kcal/mol}$) que refuerza lo anterior, además de que varias conformaciones se colocan de manera muy similar en la misma región.

Puesto que el acoplamiento automático no permite restringir un espacio definido de búsqueda, se realizó un acoplamiento molecular o *docking* restringido únicamente al entorno del sitio de unión de la FC. Prácticamente ninguna de las conformaciones obtenidas se ubican cerca o dentro de la cavidad de la FC que resulta muy pequeña, además de que todos los ligandos muestran en promedio energías de interacción positivas y de magnitud elevada ($\Delta G_{\text{binding}} = 16 \text{ Kcal/mol}$, **Figura 31**), sinónimo de una interacción poco favorable. Únicamente una de las conformaciones se acopló inadecuadamente a este sitio, mostrándose parcialmente inmerso, aunque su energía libre de interacción señala que no se une a este sitio (esquina inferior derecha, **Figura 31**).

Acoplamiento molecular restringido del lípido A con la proteína de unión a Lipopolisacárido

Esta vez, mediante acoplamiento molecular o *docking* restringido, se estudia la interacción del LA con la LBP, en el sitio de unión de LA reportado (**Figura 32**) [47].

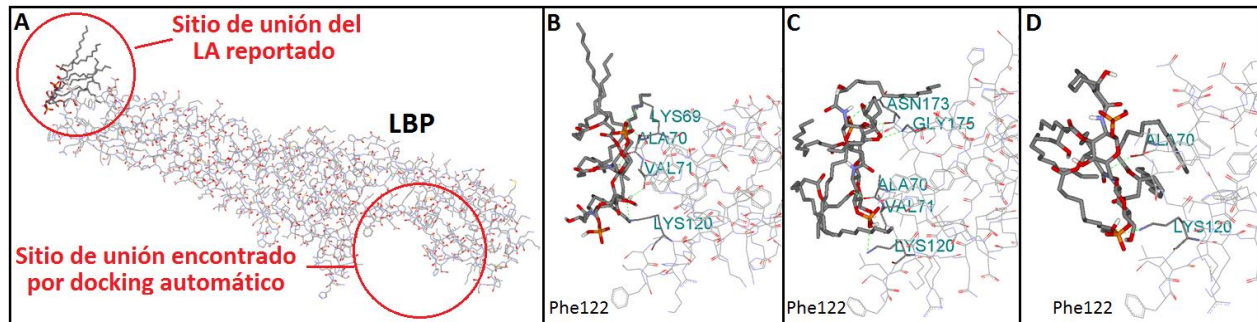


Figura 32. Acoplamiento molecular entre el LA y la proteína LBP restringido al sitio de unión reportado. **A:** Sitio de unión del LA reportado en la LBP [47]. **B, C, D:** Diferentes modos de unión del LA en el sitio de unión reportado. Destacan la Ala70 y sobretodo la Lys120 como residuos que participan en la interacción.

Como se observa en la **Figura 32**, panel **A**, el sitio de unión reportado se ubica en el lado contrario al encontrado. Esta vez se restringió la búsqueda al sitio de unión reportado (que no se trata como tal de una cavidad, **Figura 32**, **A**), encontrando diferentes posibles modos de unión. Las conformaciones aquí generadas (**Figura 32**, **B, C, D**), están por encima del residuo de fenilalanina 122 (Phe122). Los residuos de alanina 70 (Ala70) y lisina 120 (Lys120) parecen participar en la interacción con el LA, sobre todo el último. De los tres modos de interacción presentados en la **Figura 32**, el que se muestra en el panel **B** parece estar más relacionado al proceso de transferencia del LA al MD-2, si bien las cadenas acilo no podrían estar tan expuestas al agua, estas tendrían que exponerse en algún momento para poder ingresar a la cavidad hidrofóbica del MD-2. No se reportan las energías de interacción, las cuales son positivas para los tres modos de unión propuestos. Lo anterior puede deberse justamente a que la LBP participa en un proceso de transferencia. Una energía de unión elevada indicaría que la separación del LA de la LBP en la transferencia hacía el complejo receptor TRL4/MD-2 resultaría energéticamente poco favorable, por lo que no extraña que la energía de unión entre el LA y la LBP hable de una baja afinidad. Hasta la fecha, no se conoce por estudios de cristalografía de rayos-X el modo de unión del LA a la LBP. De esta forma, se ofrecen tres propuestas teóricas al respecto.

Conclusiones

Se han mapeado los residuos aminoacídicos que interactúan con los grupos fosfato del L4a, dentro de la interfaz triangular de interacciones denominada *Wedge*, de los complejos receptores TLR4/MD-2 de las especies humana, murina y equina. El modelo del *Wedge* es la principal aportación de este trabajo.

Se realizaron adecuaciones al primer modelo del *Wedge* propuesto. Por primera vez se presenta el *Wedge* de la especie canina, cuyo complejo receptor fue modelado por homología con buena calidad.

En base al análisis de las cargas totales en los sitios del *Wedge*, se ha concluido que el sitio Pag de la especie murina presenta la carga neta más elevada entre las cuatro especies, lo cual favorece la dimerización y activación del complejo receptor al interactuar con derivados del LPS.

Se ha determinado que el efecto especie-específico del L4a no depende de los grupos fosfato.

Se presentan tres posibles modos de unión entre el lípido A y la proteína LBP en el sitio de unión reportado.

Referencias

1. Aderem A, Ulevitch R J. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406:782-787.
2. Meng J, Lien E, Golenbock D T. 2010. MD-2-mediated ionic interactions between lipid A and TLR4 are essential for receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285:8695-8702.
3. Carrillo-Esper R, Carrillo-Córdova J R, Carrillo-Córdova L D. 2010. Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas. *Cirugía y Cirujanos*, 77(4):301-308.
4. Alexander C, Rietschel E T. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research*, 7(3):301-308.
5. Takeuchi O, Akira S. 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140:805-820.
6. Saavedra P G, Vásquez G M, González L A. 2011. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia*, 24(2):157-166.
7. Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T. 2012. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *PNAS*, 109(19):7421-7426.
8. Scior T, Alexander C, Zaehring U. 2013. Reviewing and identifying amino acids of human, murine, canine and equine TLR4 / MD-2 receptor complexes conferring endotoxic innate immunity activation by LPS/lipid A, or antagonistic effects by Eritoran, in contrast to species-dependent modulation by lipid IVA. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 5(6):1-13.
9. Ittig S, Lindner B, Stenta M, Manfredi P, Zdorovenko E, Knirel Y A, dal Peraro M, Cornelis G R, Zähringer U. 2012. The Lipopolysaccharide from *Campylobacter jejuni* Reveals an Unexpected Role of the Core-Oligosaccharide in MD-2 Binding. *Plos*, 8(5):1-18.
10. Akashi S, Nagai Y, Ogata H, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Kawasaki K, Nishijima M, Hayashi S, Kimoto M, Miyake K. 2001. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *International Immunology*, 13(12):1595-1599.
11. Dziarski R, Wang Q, Miyake K, Kirschning C J, Gupta D. 2001. MD-2 Enables Toll-Like Receptor 2 (TLR2)-Mediated Responses to Lipopolysaccharide and Enhances TLR2-Mediated Responses to Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria and Their Cell Wall Components. *The Journal of Immunology*, 166:1938-1944.
12. Meng J, Drolet J R, Monks B G, Golenbock D T. 2010. MD-2 Residues Tyrosine 42, Arginine 69, Aspartic Acid 122, and Leucine 125 Provide Species Specificity for Lipid IVA. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(36):27935-27943.
13. Kang Y, Lee J. 2011. Structural Biology of the Toll-Like Receptor Family. *Annual Review of Biochemistry*, 80:917-941.
14. Park B S, Song D H, Kim H M, Choi B, Lee H, Lee J. 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458:1191-1195.
15. Scior T, Lozano-Aponte J, Echeverria D. 2009. CAMD Y CADD. Simulaciones moleculares computacionales de fármacos. Parte 1. *Informacéutico*, 16(5):46-50.
16. Scior T, Lozano-Aponte J, Echeverria D. 2009. CAMD Y CADD. Simulaciones moleculares computacionales de fármacos. Parte 2. *Informacéutico*, 16(6):32-35.
17. Scior T, Medina Franco J L, Do Q-T, Martínez-Mayorga K, Yunes-Rojas J A, Bernard P. 2009. How to Recognize and Workaround Pitfalls in QSAR Studies: A Critical Review. *Current Medicinal Chemistry*, 16(32):4297-4313.
18. Lozano-Aponte J, Scior T. 2012. Que sabe usted de QSAR? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(2):82-84.
19. Halperin I, Ma B, Wolfson H, Nussinov R. 2002. Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 47(4):409-443.
20. Morris G M, Goodsell D S, Halliday R S, Huey R, Hart W E, Belew R K, Olson A J. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14):1639-1662.
21. Meller J. 2001. Molecular Dynamics. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, pàgs. 1-8 / www.els.net.
22. Cai W, Li J, Yip S. 2012. Molecular Dynamics. In: Konings R J M, (ed.) Comprehensive Nuclear Materials, vol. 1, pags. 249-265, Amsterdam: Elsevier.
23. Lozano-Aponte J, Scior T. 2014. ¿Qué sabe Ud. Acerca de... Dinámica Molecular? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(1):86-88.

24. Li J. 2005. Basic Molecular Dynamics. Handbook of Materials Modeling. Springer. págs.565-588.
25. Berman H M, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat T N, Weissig H, Shindyalov I N, Bourne P E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1):235-242.
26. Ohto U, Fukase K, Miyake K, Satow Y. 2007. Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVA. *Science*, 316(5831):1632-1634.
27. UniProt Consortium, 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue):D204-212.
28. Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.
29. Scior T, Wahab A. 2007. Structure prediction of proteins with very low homology: A comprehensive introduction and a case study on aminopeptidase. In: Stanley P. Kaplan, editor. *Drug Design Research Perspectives*. Nova Science Publishers; p. 675-708.
30. Krivov G G, Shapovalov M V, Dunbrack R L Jr. 2009. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. *Proteins*, 77(4):778-795.
31. Morris G M, Huey R, Lindstrom W, Sanner M F, Belew R K, Goodsell D S, Olson A J. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16):2785-2791.
32. Scior T, Lozano-Aponte J, Figueroa-Vazquez V, Yunes-Rojas J A, Zähringer U, Alexander 2013. C..Three-dimensional mapping of differential amino acids of human, murine, canine and equine TLR4/MD-2 receptor complexes conferring endotoxic activation by lipid A, antagonism by Eritoran and speciesdependent activities of Lipid IVA in the mammalian LPS sensor system. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 7(9):1-11.
33. Berendsen H J C, van der Spoel D, van Drunen R. 1995. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, 91(1-3):43-56.
34. van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark A E, Berendsen H J C. 2005. GROMACS: Fast, Flexible and Free. *Journal of Computational Chemistry*, 26:1701-1718,
35. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E. 2008. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(3):435-447.
36. Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts M R, Smith J C, Kasson P M, van der Spoel D, Hess B, Lindahl E. 2013. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29:845-854.
37. Abraham M J, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith J C, Hess B, Lindahl E. 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1:19-25.
38. Allen M P, Tildesley D J. Computer Simulation of Liquids, Chapter 2: Statistical Mechanics. Clarendon Press; 1989, New Ed. Oxford Science Publications, págs. 33-70.
39. Frenkel D. Understanding Molecular Simulation, Part II: Ensembles, 2002, Academic Press. págs. 109-135.
40. Humphrey W, Dalke A. 1996. VMD - Visual Molecular Dynamics, *Journal of Molecular Graphics*, 14:33-38.
41. Paul J. Turner Center for Coastal and Land-Margin Research Oregon Graduate Institute of Science and Technology Beaverton, Oregon.
42. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2017 (*última visita: junio 2017*).
43. Wang Y, Su L, Morin M D, Jones B T, Whitby L R, Surakattula M M, Huang H, Shi H, Choi J H, Wang K W, Moresco E M, Berger M, Zhan X, Zhang H, Boger D L, Beutler B. 2016. TLR4/MD-2 activation by a synthetic agonist with no similarity to LPS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113:E884-E893.
44. Ohto O, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T. 2012. Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *The Journal of Biological Chemistry*, 287:40611-40617.
45. Kim H M, Park B S, Kim J I, Kim S E, Lee J, Oh S C, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo O J, Lee J O. 2007. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*, 130:906-17.
46. Lemkul J A, Allen W J, Bevan D R. 2010. Practical Considerations for Building GROMOS-Compatible Small-Molecule Topologies. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50(12):2221-2235.
47. Eckert J K, Kim Y J, Kim J I, Gürtler K, Oh D Y, Sur S, Lundvall L, Hamann L, van der Ploeg A, Pickkers P, Giamarellos-Bourboulis E, Kubarenko A V, Weber A N, Kabesch M, Kumpf O, An H J, Lee J O, Schumann R R. 2013. The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity*, 39(4):647-60.

Apéndice

A1. Evaluación de las cargas del grupo fosfato en un sistema bifásico ciclohexano/agua (Metodología)

Este paso resulta crucial en el estudio, pues permite analizar el comportamiento del grupo fosfato monoaniónico (fosfato diácido), ya que se ha reportado que uno de las mayores complicaciones en dinámica molecular es la asignación de cargas atómicas para el ligando [46]. Con este fin, se construyeron celdas cúbicas de 5 nm y se llenaron con moléculas de agua y de ciclohexano, es decir, un sistema acuoso y uno hidrofóbico, respectivamente, los cuales son sometidos por separado a un proceso de minimización de energía. Posteriormente fueron equilibradas en un primer ensamble NVT a 300 K por 0.2 nanosegundos y un segundo ensamble NPT a 300 K por 1 ns [38,39]. El equilibramiento es un paso que permite la “relajación” del sistema, es decir, que adopte características adecuadas en cuanto a energía, distancia entre moléculas, distribución de las mismas y densidad, lo cual se hace por separado pues cada sistema molecular presenta características fisicoquímicas diferentes. Una vez que se tienen ambos sistemas equilibrados, estos se fusionan por una de las caras de la celda, con dimensiones cercanas a los 5 nm (en el ensamble NPT el volumen no es constante, por lo que los sistemas generalmente tienden a expandirse o contraerse) y se ajusta el más grande en función del más pequeño, formando una celda rectangular (paralelepípedo), obteniendo un sistema bifásico. El fosfato es colocado en el borde entre ambas fases y se agrega un contraión de Na^+ para contrarrestar la carga neta del fosfato diácido (-1), el cual es colocado al azar por el programa en la fase acuosa. Construido el sistema bifásico ciclohexano/agua, se sometió a minimización de energía (*st*) y se simuló mediante dinámica molecular en un ensamble NVT a 300 K por 60 ns para observar el desplazamiento del fosfato hacia alguna de las fases y su interacción con el contraión [A1,A2].

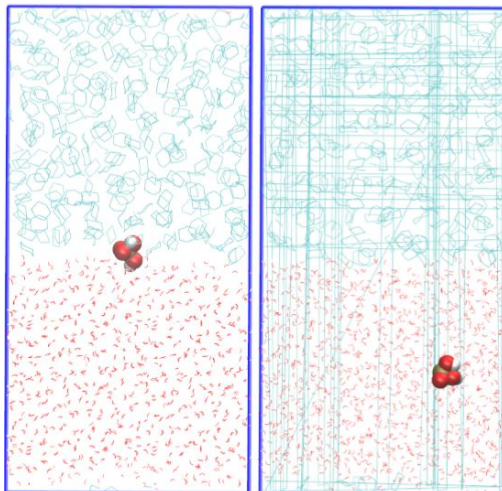
A2. Evaluación de la difusión del grupo fosfato en un sistema acuoso (Metodología)

Con la finalidad de complementar la evaluación de las cargas del fosfato diácido, se analizó su comportamiento en un sistema acuoso para evitar la influencia de la fase hidrofóbica en la difusión del ligando. Se construyó una celda cúbica de 6 nm y se llenó con agua, colocando al fosfato al centro de la celda, nuevamente agregando un contraión de Na^+ . El sistema fue sometido nuevamente a minimización de energía y equilibramiento por NVT a 300 K por 0.2 ns y NPT a

300 K por 1 ns. Finalmente, se corrió la dinámica molecular en un ensamble NPT a 300 K por 40 ns para el cálculo del coeficiente de difusión del fosfato y para monitorear sus interacciones con el contraión.

A3. Evaluación de las cargas del grupo fosfato en un sistema bifásico ciclohexano/agua

Cada grupo fosfato que flanquea al anillo diglucosamino del L4a tiene carga neta -1, por lo que se evaluó el comportamiento del fosfato diácido en un sistema bifásico ciclohexano/agua, el cual presenta la misma carga neta y cuya presencia está justificada a pH 7 pues la disociación $\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightarrow \text{H}^+ + \text{HPO}_4^{2-}$ tiene un $\text{pK}_a = 7.21$ [A3]. Al tener dos fases de diferente naturaleza (no polar/polar), se espera que el fosfato diácido (monoaniónico) se difunda hacia la fase acuosa. Al evaluarse el comportamiento del fosfato utilizado en las pruebas iniciales, se observó que efectivamente este se desplaza hacia la fase polar, pero con valores negativos del coeficiente de difusión (medida de la tendencia de un soluto para difundirse en un disolvente determinado), lo cual no es posible, además de presentar una fuerte atracción por el contraión Na^+ , pues una vez que interactuaban, estos no se separaban. Esto último resulta crucial pues debemos recordar que el agua posee una constante dieléctrica sumamente elevada a 300 K (78.3) [A4,A5], que tiende a separar a las sustancias iónicas por efecto de solvatación. Lo anterior mostró que las cargas asignadas en un inicio al fosfato, y utilizadas en primeras simulaciones eran incorrectas, por lo que fueron corregidas y evaluadas nuevamente, con lo que se observó un comportamiento adecuado (**Figura A1**).



Coefficiente de Difusión del fosfato = **$0.97 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$** .

Valor experimental = $1.023 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ [A6].

Tensión interfacial ciclohexano/agua = **48.95 mN/m** .

Valor experimental = 51 mN/m [A7].

Figura A1. Evaluación de la difusión del grupo fosfato del L4a en un sistema bifásico ciclohexano/agua (cian/rojo, arriba y abajo, respectivamente, en cada recuadro). Al inicio de la simulación (lado izquierdo), se observa el fosfato colocado intencionalmente entre las dos fases (representación de esferas en color rojo). Al paso del tiempo (lado derecho), se observa la difusión del fosfato hacia la fase acuosa o polar. El cálculo de la tensión interfacial del sistema fue realizado en base a lo reportado en la literatura [A8].

Con las modificaciones realizadas, el fosfato presenta un coeficiente de difusión cercano al valor experimental (**Figura A1**), además de que este interactuaba con el contraión para después separarse, lo cual puede interpretarse como un comportamiento fisicoquímico adecuado. A pesar de la presencia de interacciones carga-carga en medio acuoso, estas no son tan fuertes en presencia de agua. A pesar de que el valor del coeficiente de difusión obtenido resultó muy cercano al experimental reportado, en este sistema, se debe guardar reserva sobre este valor, pues existe la influencia de la fase hidrofóbica que puede afectar su difusión, por efectos repulsivos, por lo que este dato fue calculado en un sistema acuoso. Se realizó el cálculo de la tensión interfacial (**Figura A1**) [A8] y se generó el perfil de densidades del sistema (**Figura A2**) como una forma de comprobar sus propiedades fisicoquímicas. Si ambas mediciones tuvieran valores muy diferentes a los experimentales, la caracterización del fosfato no habría sido adecuada.

A4. Evaluación de la difusión del grupo fosfato en un sistema acuoso

Para reforzar lo anterior, se evaluó la difusión del fosfato diácido solamente en agua (difusión en “bulto”), evitando cualquier interferencia que pudiera tener la fase hidrofóbica, obteniendo un valor de $1.026 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, valor aún más cercano al reportado de forma experimental [A6]. Por lo que se asume que el fosfato diácido ha sido bien parametrizado y caracterizado, y que puede ser utilizado para el estudio de la preferencia posicional mediante dinámica molecular con el complejo receptor TLR4/MD-2. Por último, se generaron los perfiles de densidad de los sistemas de evaluación utilizados como un parámetro de sus cualidades (**Figura A2**). En ambos casos, se obtienen densidades muy cercanas a las reportadas experimentalmente [A9].

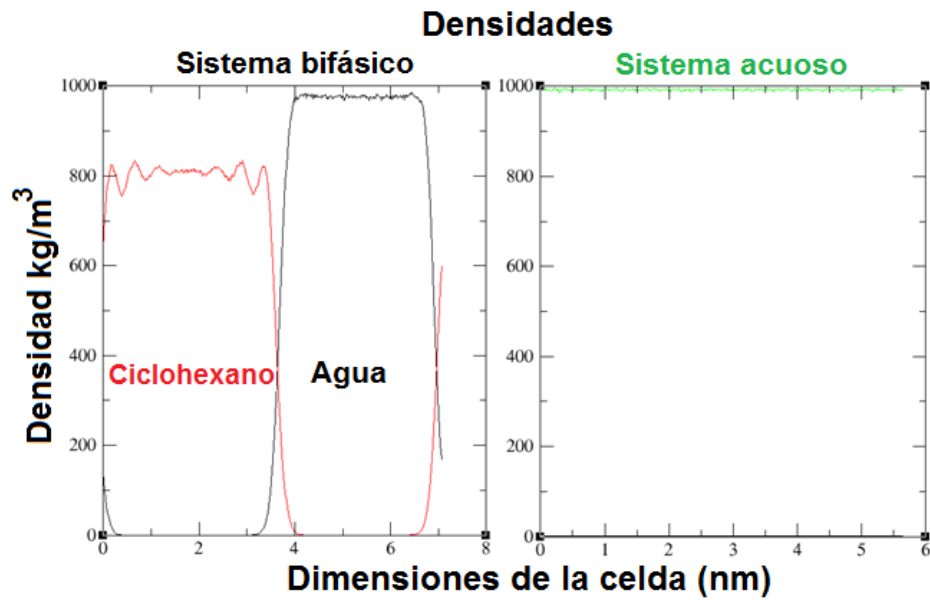


Figura A2. Perfiles de densidad para el sistema bifásico ciclohexano/agua (izquierda) y sistema acuoso (derecha). Nota: La escala del tamaño de celda del eje de las abscisas (eje x) no es igual pues las dimensiones de las celdas son diferentes en cada sistema. La escala de densidades del eje de las ordenadas (y) es la misma.

A5. Cargas parciales de la sonda fosfato y residuos aminoacídicos de *Wedge*

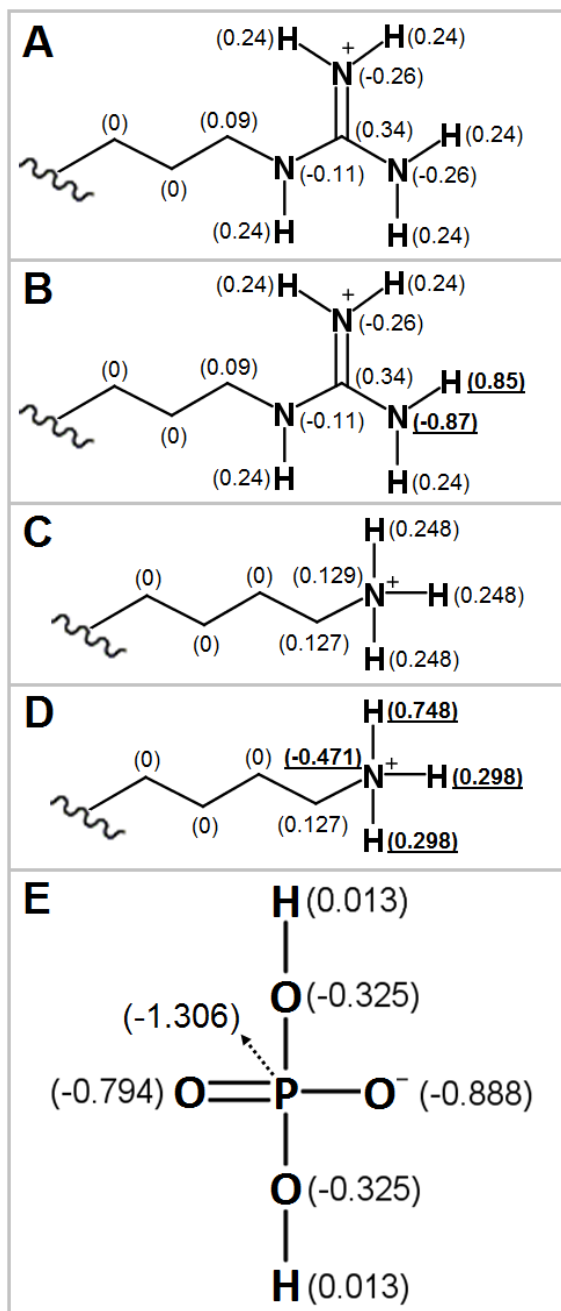


Figura A3. Cargas parciales asignadas de forma manual en base a pruebas de perfil de interacción. (A) Cargas asignadas por default para argininas del *Wedge*; (B) Cargas modificadas manualmente para argininas del *Wedge*; (C) Cargas asignadas por default para lisinas del *Wedge*; (D) Cargas modificadas manualmente para lisinas del *Wedge*; (E) Fosfato monoaniónico como sonda (H_2PO_4^-). Los paneles B y D derivan de cargas *standard* asignadas por el programa Gromacs. El panel E es una modificación manual del modelo obtenido con el programa PRODRG [A10]. Con las cargas asignadas al fosfato se logró caracterizar adecuadamente (A1-A4).

A6. Distancias de interacción de grupos fosfato con residuos del *Wedge* (pruebas iniciales concluidas)

Las distancias de interacción en función del tiempo, entre las tres sondas y los residuos del *Wedge* dimérico ([shortTLR4*/TLR4/MD-2/3P]) de las cuatro especies se muestran en la **Figura A4**, **Figura A5**, **Figura A6** y **Figura A7**.

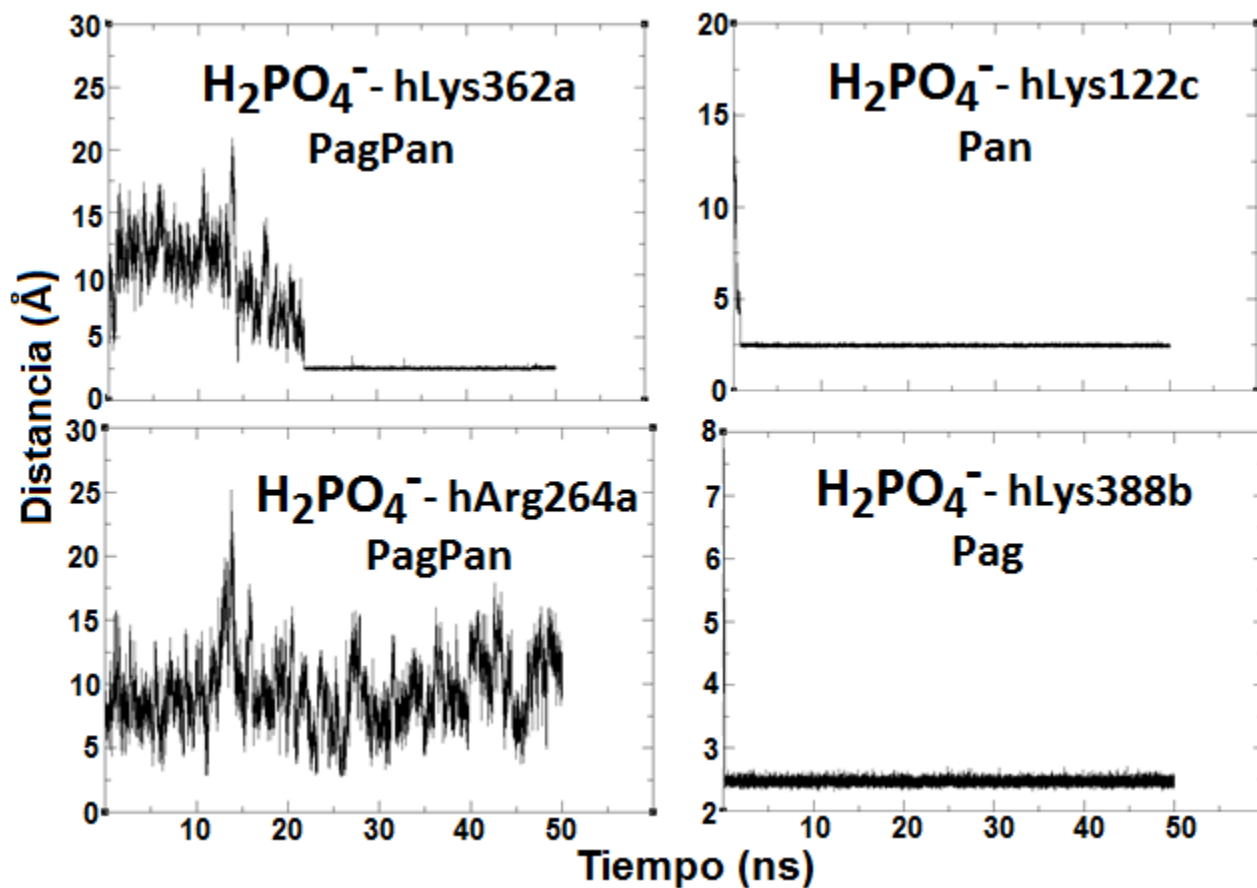


Figura A4. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre los grupos fosfato (en los tres sitios del *Wedge* como posición inicial) y los residuos del *Wedge* dimérico humano (h[shortTLR4*/TLR4/MD-2/3P]). En el sitio PagPan, una vez que se forma la interacción con el residuo hLys362a, esta se mantiene estable, no así con el residuo hArg264a del mismo sitio, por el cual la sonda no muestra preferencia. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

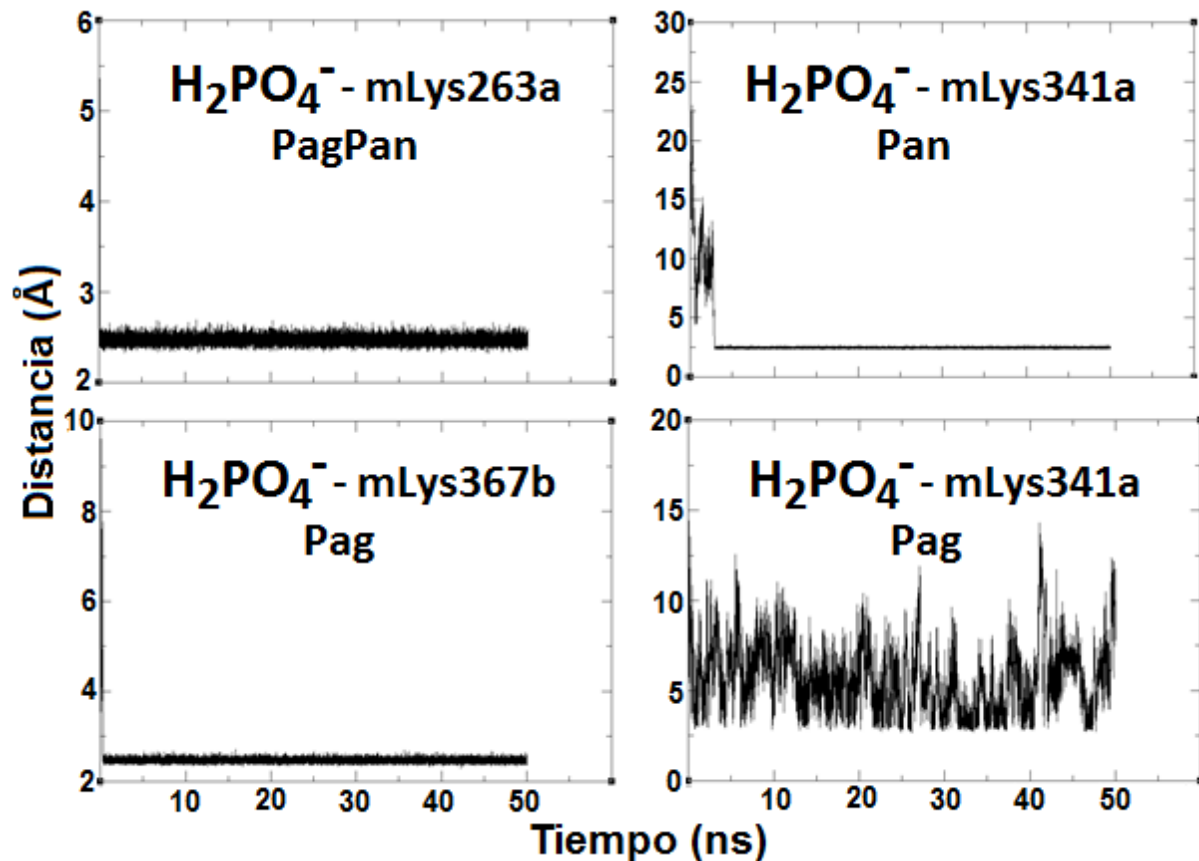


Figura A5. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre los grupos fosfato (en los tres sitios del *Wedge* como posición inicial) y los residuos del *Wedge* dimérico murino (m[shortTLR4*/TLR4/MD-2/3P]). El residuo mLys367 muestra clara preferencia por el fosfato colocado inicialmente en el sitio Pag, el cual también muestra interacciones con el residuo mLys341a, aunque no de forma contundente. Curiosamente, el fosfato que fue colocado inicialmente en Pan muestra clara interacción con el residuo hLys341a del sitio Pag. Ninguna sonda muestra preferencia por el sitio Pan. Aunque se trata de pruebas iniciales, esto da un indicio del efecto a esperar en simulaciones formales. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

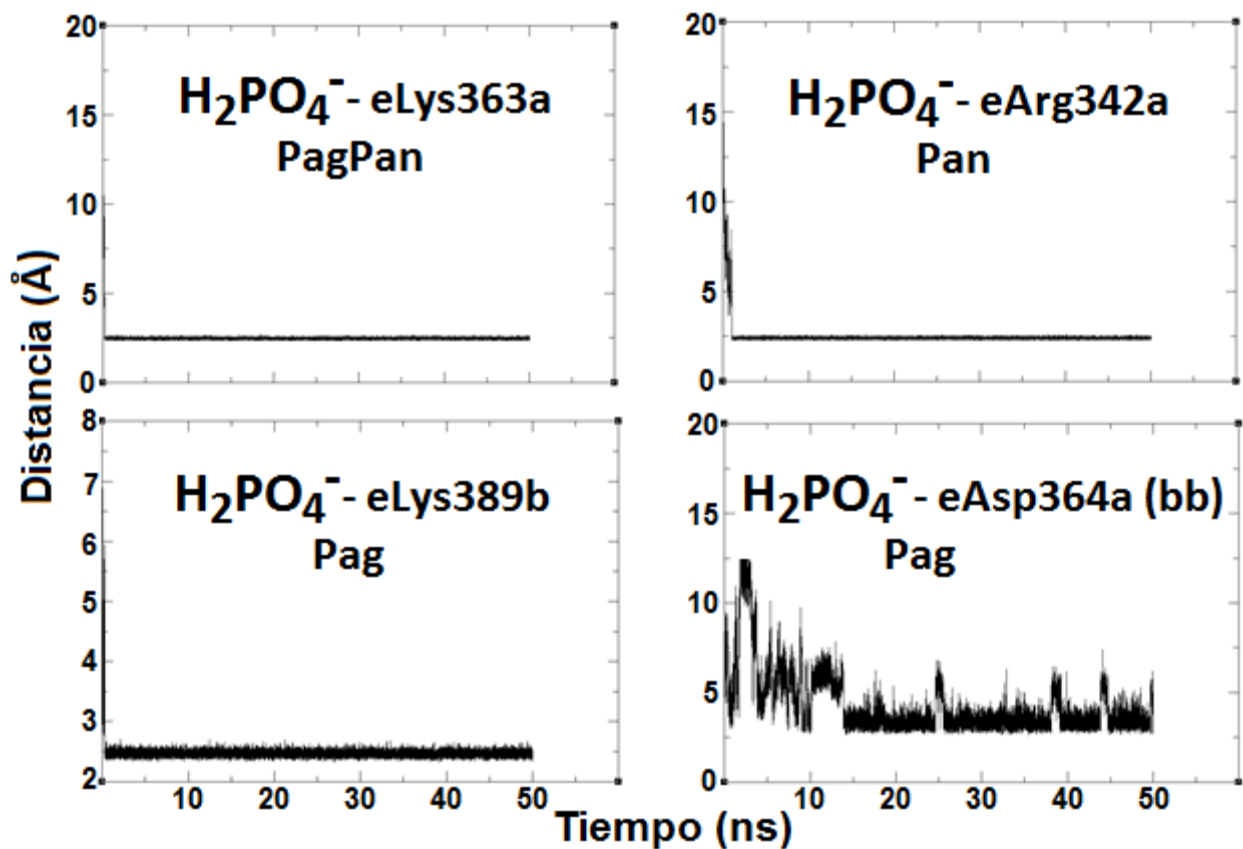


Figura A6. Gráficos de distancia de interacción (eje y , Å) vs tiempo (eje x , ns) entre los grupos fosfato (en los tres sitios del *Wedge* como posición inicial) y los residuos del *Wedge* dimérico equino (e[shortTLR4*/TLR4/MD-2/3P]). Similar al caso murino (que muestra el mismo efecto reportado pero de forma parcial), las sondas muestran preferencia por el sitio Pag. La interacción con la cadena principal (*backbone*, bb) del residuo eAsp364a resulta al parecer debido a que el fosfato colocado en posición inicial Pag no deja espacio. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

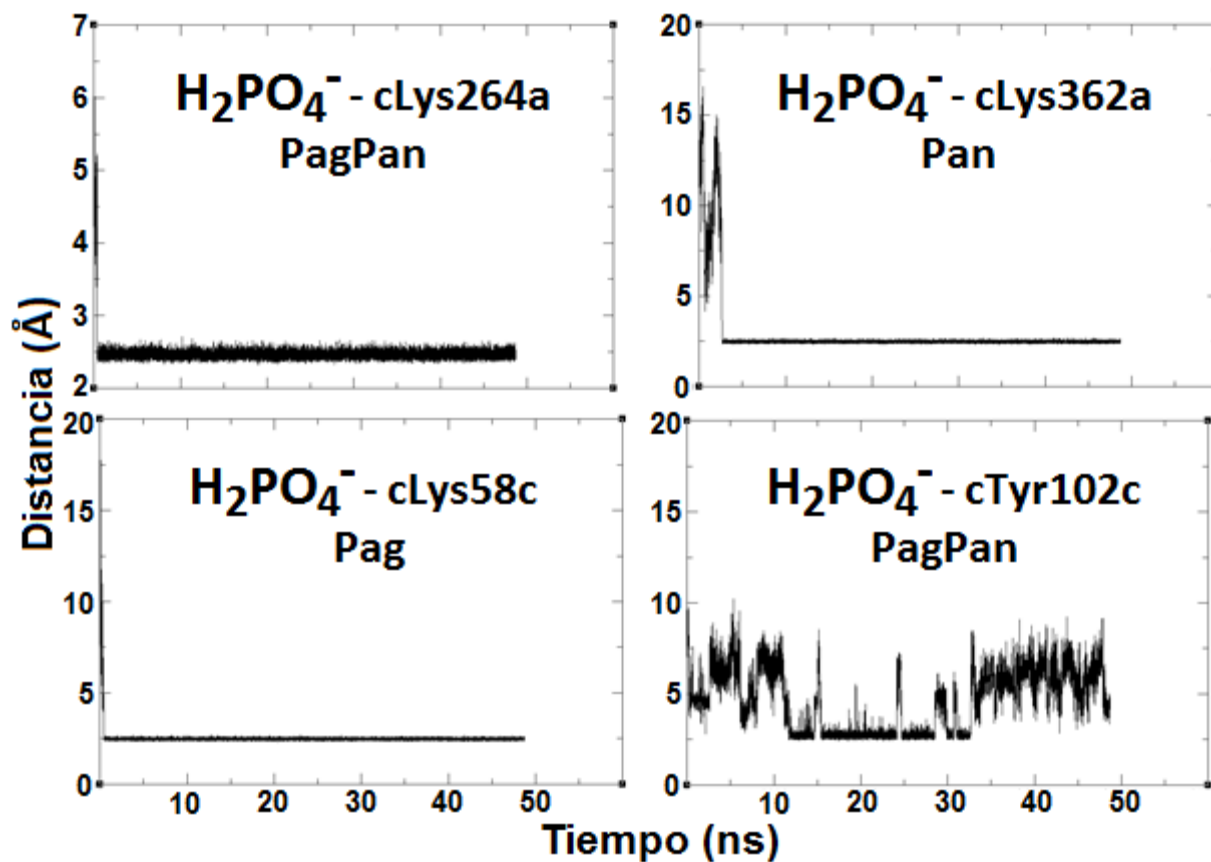


Figura A7. Gráficos de distancia de interacción (eje y , Å) vs tiempo (eje x , ns) entre los grupos fosfato (en los tres sitios del *Wedge* como posición inicial) y los residuos del *Wedge* dimérico canino (c[shortTLR4*/TLR4/MD-2/3P]). De las cuatro especies, la especie canina no muestra una clara tendencia, el fosfato colocado inicialmente en Pag se mueve a una zona intermedia entre los sitios Pag y PagPan interactuando con cLys58c, mientras que el fosfato colocado en posición inicial Pan se mueve al sitio PagPan. Los residuos de tirosina se comportan de forma similar a lo mostrado en esta imagen (abajo, derecha), interactuando de forma intermitente con los fosfatos. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

A7. Preferencia posicional de los grupos fosfato como sonda de evaluación dentro del *Wedge*. Gráficos de distancia de interacción en función del tiempo para cada especie

Las distancias de interacción en función del tiempo, entre los grupos fosfato en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) y los residuos del *Wedge* dimérico ([shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P]) de las cuatro especies, se muestran en la **Figura A8**, **Figura A9**, **Figura A10** y **Figura A11**.

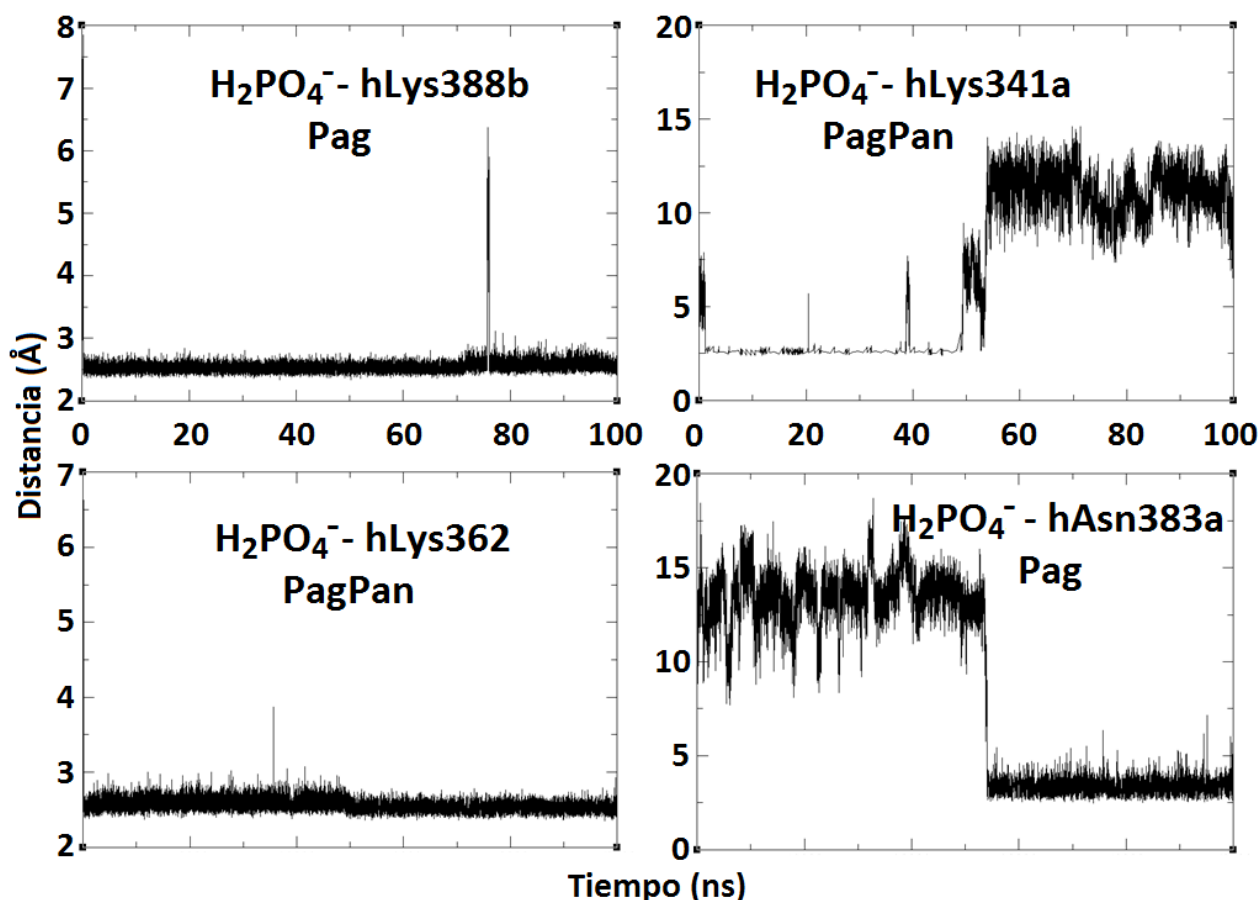


Figura A8. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) y los residuos del *Wedge* dimérico humano (h[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P], modelo No. 3 en **Tabla 5**). Las sondas muestran clara preferencia por los sitios Pag y PagPan. En los gráficos de la izquierda, se observa que un residuo (hLys341a) puede interactuar con un grupo fosfato e interactuar con otro después (fosfato en posición inicial Pag, derecha abajo). Este tipo de interacciones se lograron en base a las simulaciones iniciales. Ninguna sonda muestra preferencia por el sitio Pan. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda. Algunas líneas pronunciadas (como en el nanosegundo 75 aprox.) son consecuencia de las condiciones de frontera periódica, característica propia de las simulaciones por dinámica molecular.

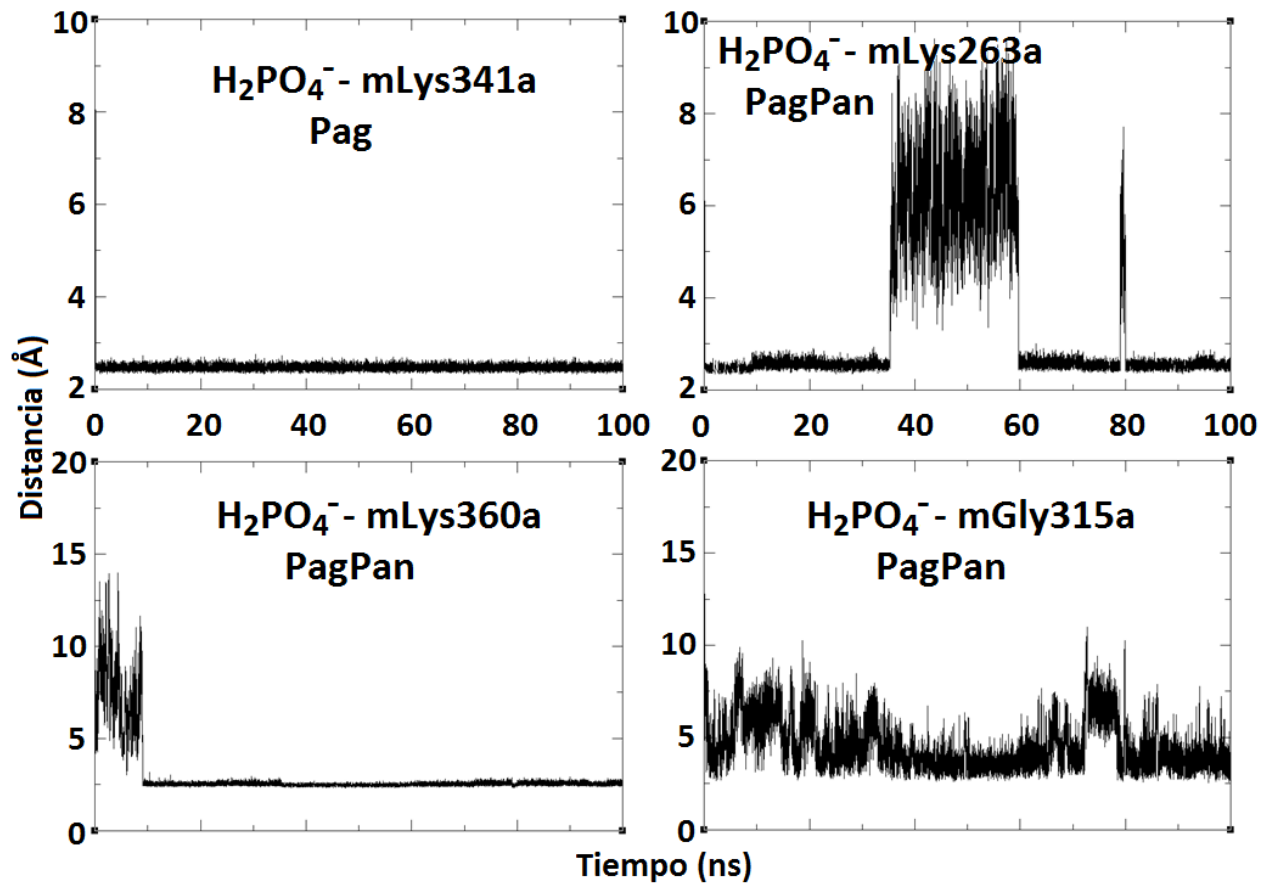


Figura A9. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) y los residuos del *Wedge* dimérico murino (m[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P], modelo No. 1 en **Tabla 5**). Las sondas muestran clara preferencia por los sitios Pag y PagPan. Aunque parece estable, nuevamente se observa que la interacción con residuos de lisina puede romperse (mLys263a) por momentos. Se encontró interacción con un residuo de glicina que no resulta común en general, pero esta interacción parece estable y constante a lo largo del tiempo. El residuo de glicina en cuestión (mGly315a) no forma parte del *Wedge*. Ninguna sonda muestra preferencia por el sitio Pan. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

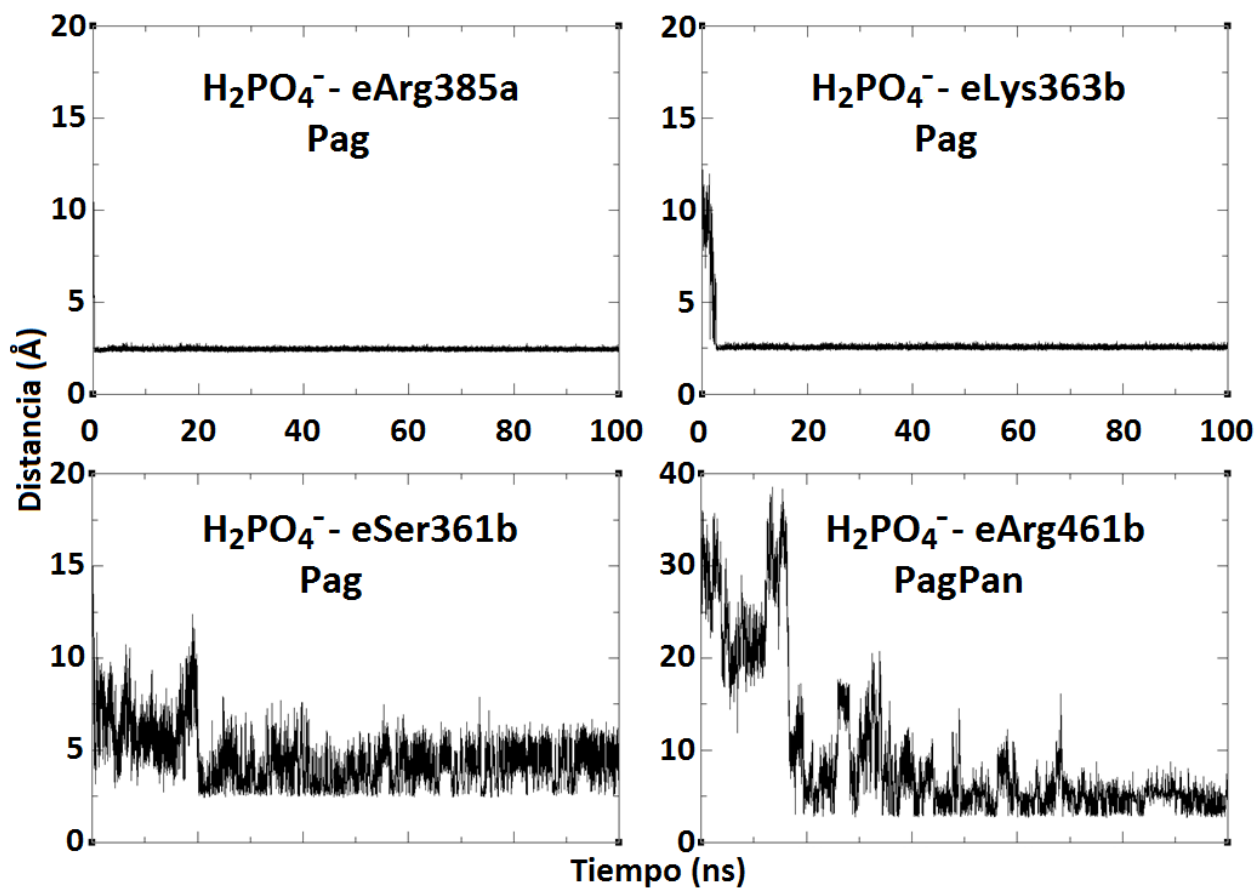


Figura A10. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) y los residuos del *Wedge* dimérico equino (e[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P], modelo No. 2 en **Tabla 5**). Las sondas muestran preferencia por los sitios Pag y PagPan. Las interacciones con serina resultan estables y parecen estabilizar otras interacciones con residuos vecinos. A pesar de lo anterior, los residuos eSer361b y eArg461b no forman parte del *Wedge*. Ninguna sonda muestra preferencia por el sitio Pan. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

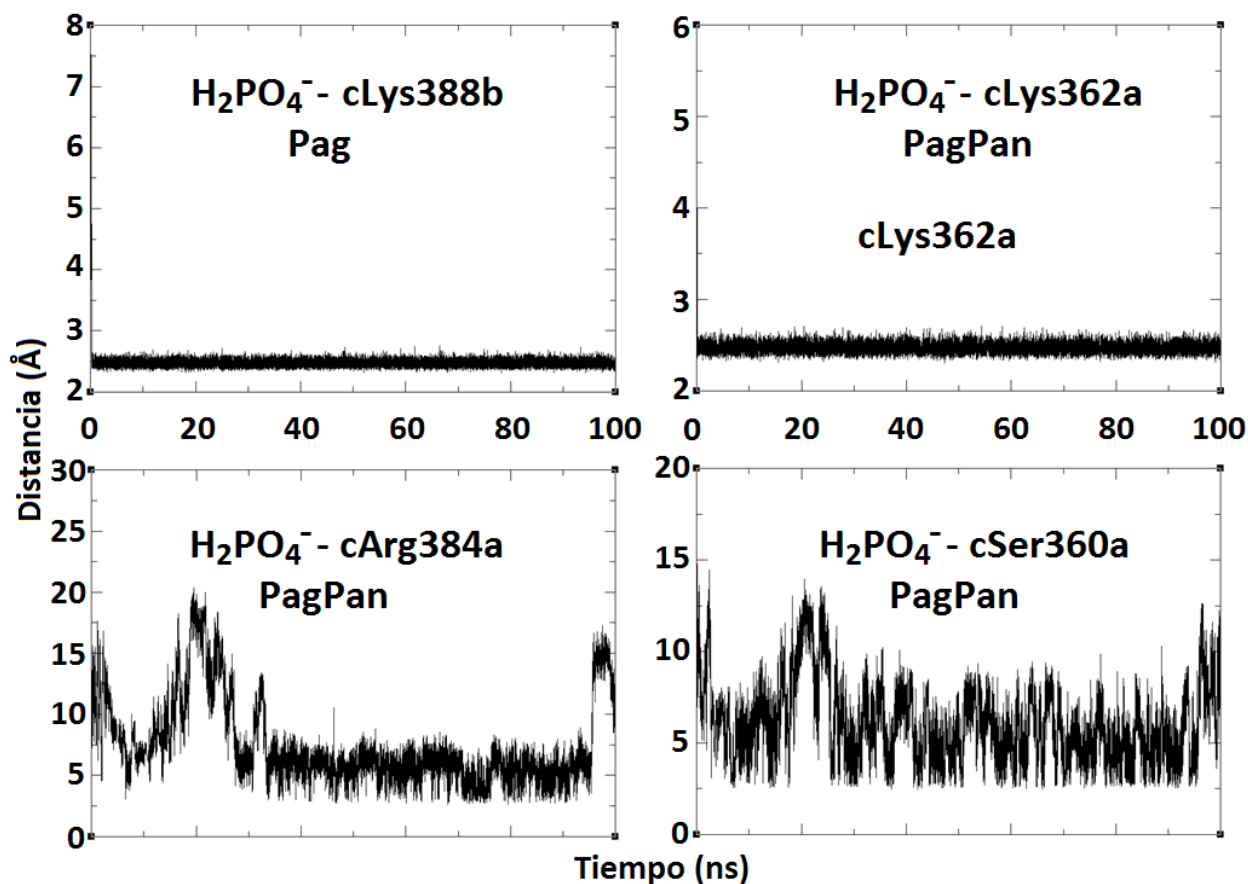


Figura A11. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) y los residuos del *Wedge* dimérico canino (c[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P], modelo No. 4 en **Tabla 5**). Las sondas muestran preferencia por los sitios Pag y PagPan. Las interacciones con serina resultan estables y parecen estabilizar otras interacciones con residuos vecinos. Nuevamente, los residuos cSer360b y eArg384a no forman parte del *Wedge*. Ninguna sonda muestra preferencia por el sitio Pan. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

Las distancias de interacción en función del tiempo, entre los grupos fosfato en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) y los residuos del *Wedge* monomérico ([TLR4/MD-2/2P]) de las cuatro especies, se muestran en la **Figura A12**, **Figura A13**, **Figura A14** y **Figura A15**.

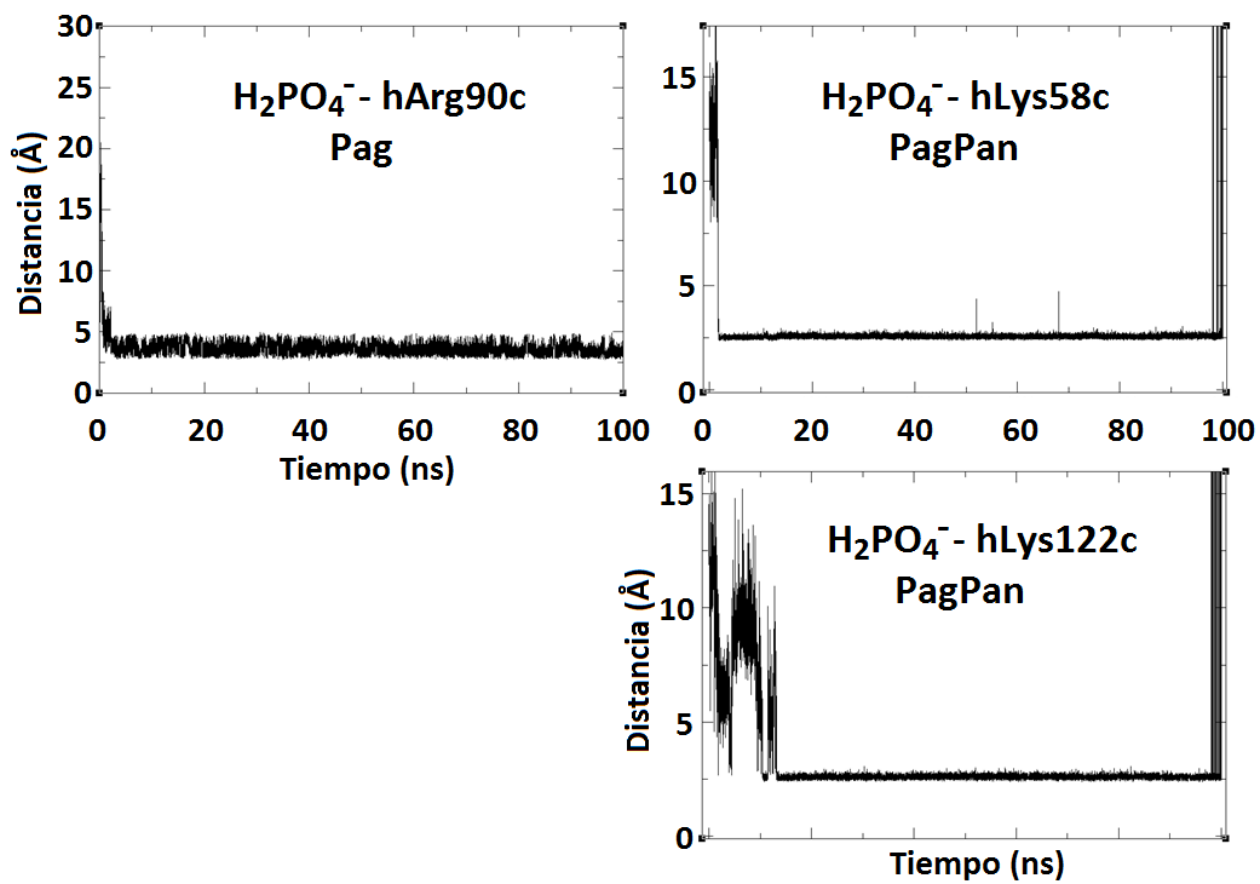


Figura A12. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) y los residuos del *Wedge* monomérico humano (h[TLR4/MD-2/2P], modelo No. 5 en **Tabla 5**). Las sondas muestran una clara preferencia por el sitio Pan, incluso la sonda en posición inicial PagPan, que en la mayoría de los casos, permanece en su sitio inicial. Los grupos fosfato no interactúan con residuos del sitio PagPan. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

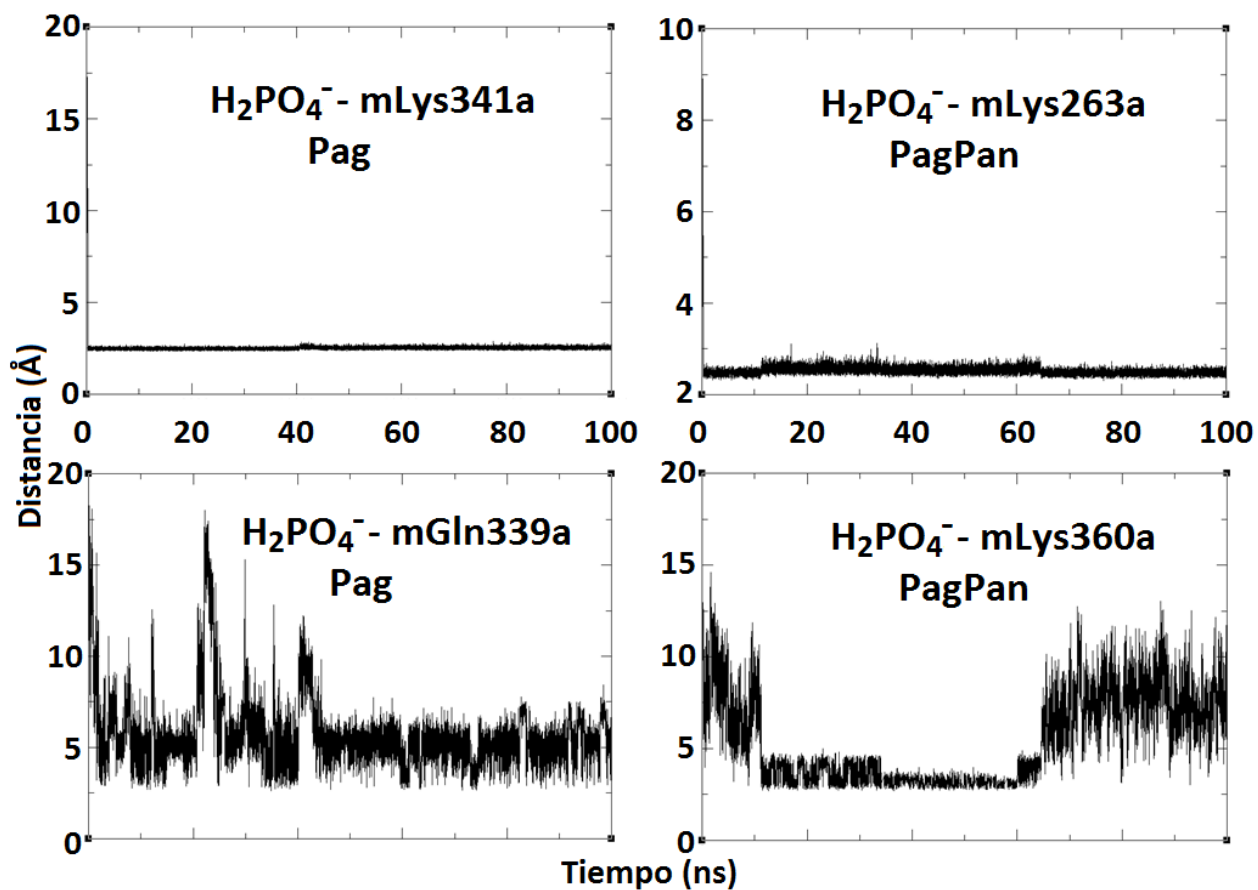


Figura A13. Gráficos de distancia de interacción (eje y , Å) vs tiempo (eje x , ns) entre el grupo fosfato en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) y los residuos del *Wedge* monomérico murino (m[TLR4/MD-2/2P], modelo No. 7 en **Tabla 5**). Las sondas muestran preferencia por los sitios Pag y PagPan. Ninguna sonda muestra preferencia por el sitio Pan. El fosfato en posición inicial PagPan interactúa con los dos residuos característicos de este sitio, mostrando influencia mutua en la interacción (derecha). El residuo mGln339a no forma parte del *Wedge*. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

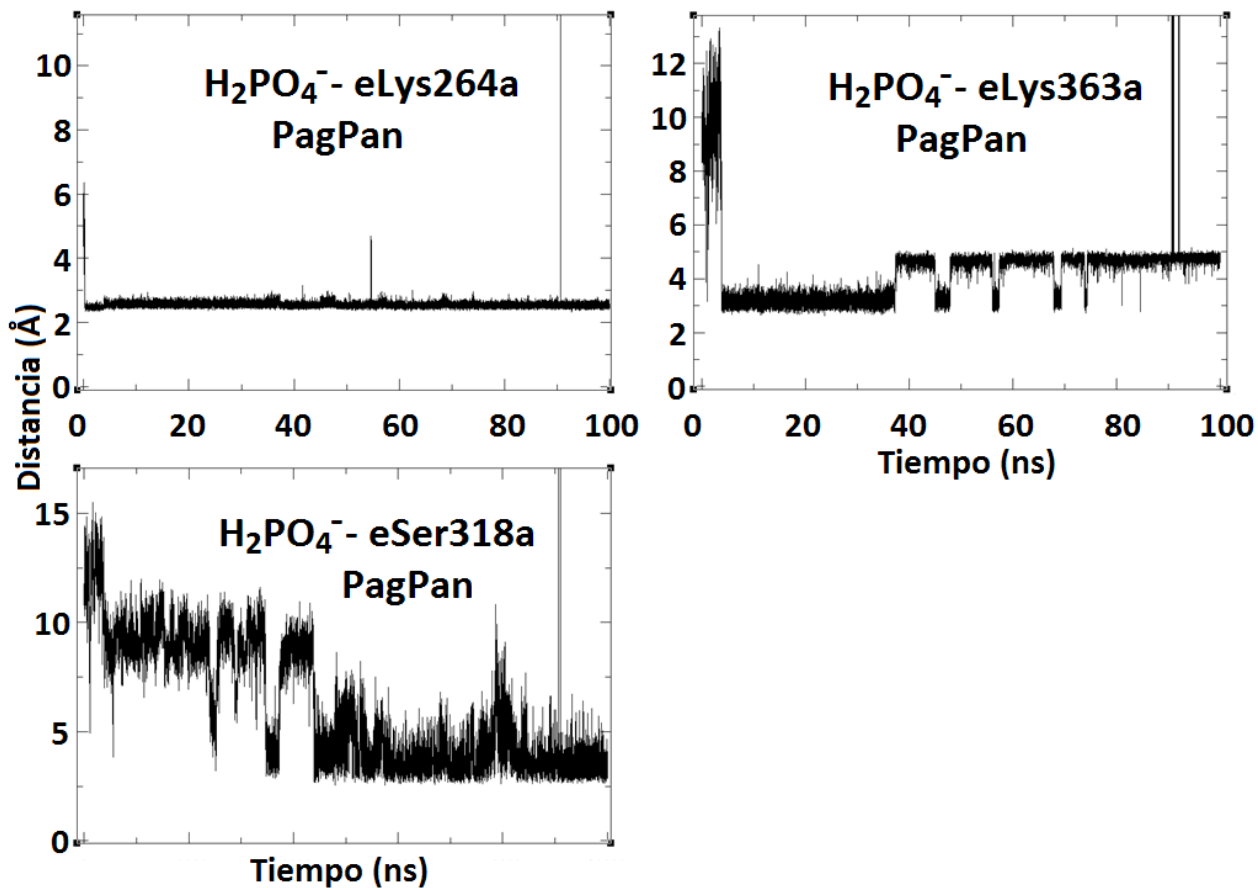


Figura A14. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) y los residuos del *Wedge* monomérico equino (e[TLR4/MD-2/2P], modelo No. 8 en **Tabla 5**). Ninguna sonda muestra preferencia por los sitios Pag y Pan. La interacción con el residuo eSer318a puede romper la interacción con residuos de lisina, aunque este residuo no pertenece al *Wedge* se encuentra próximo al sitio PagPan. La sonda en posición inicial Pag salió del *Wedge*. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

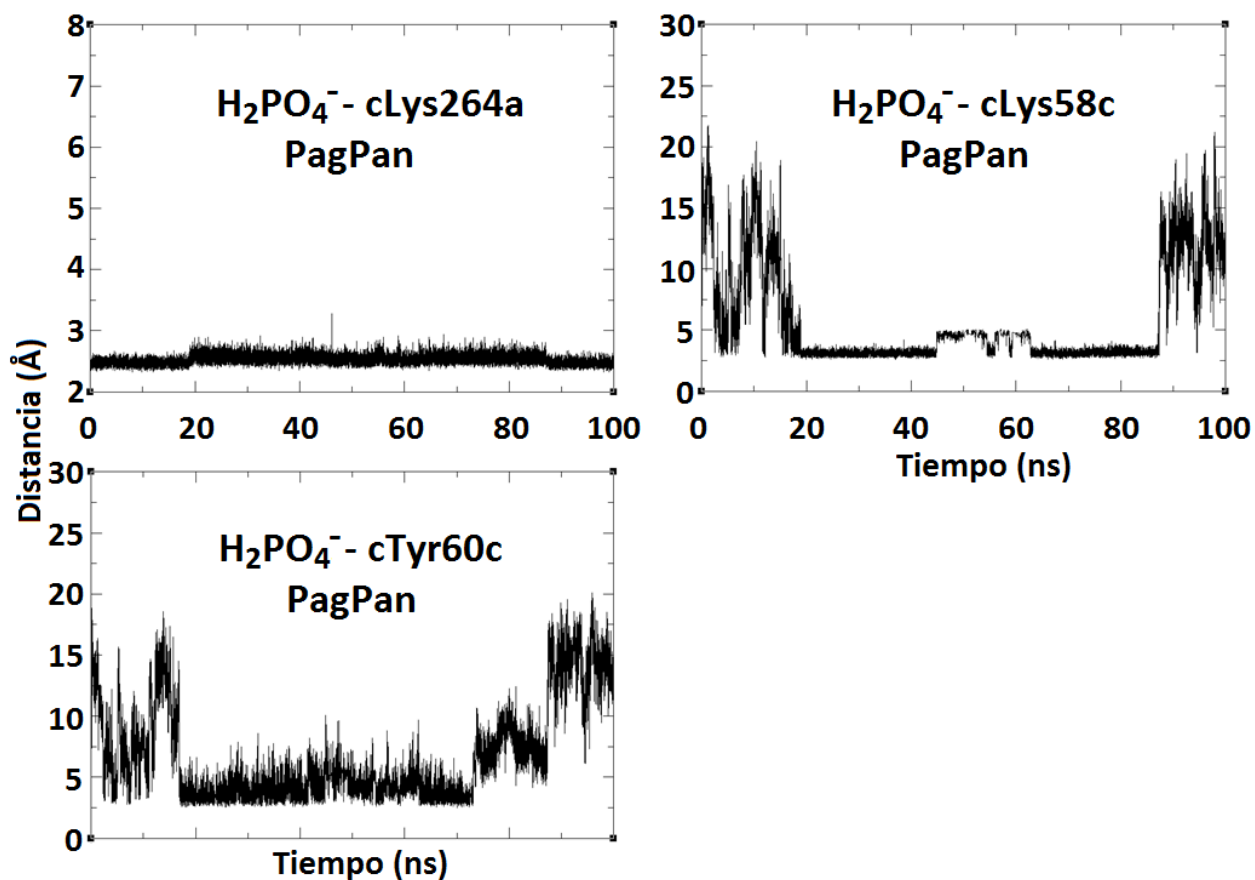


Figura A15. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial agonista (sitios Pag y PagPan) y los residuos del *Wedge* monomérico canino (c[TLR4/MD-2/2P], modelo No. 6 en **Tabla 5**). Ninguna sonda muestra preferencia por los sitios Pag. La sonda en posición inicial Pag salió del *Wedge*. El residuo cLys58c forma parte del sitio Pag, pero su cadena lateral puede moverse prácticamente hacia el sitio PagPan. Las tres interacciones mostradas tienen una influencia mutua y hacen que la sonda en posición inicial PanPan se mantenga en su sitio durante toda la simulación. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

Las distancias de interacción en función del tiempo, entre los grupos fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) y los residuos del *Wedge* dimérico ([shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P]) de las cuatro especies, se muestran en la **Figura A16**, **Figura A17**, **Figura A18** y **Figura A19**.

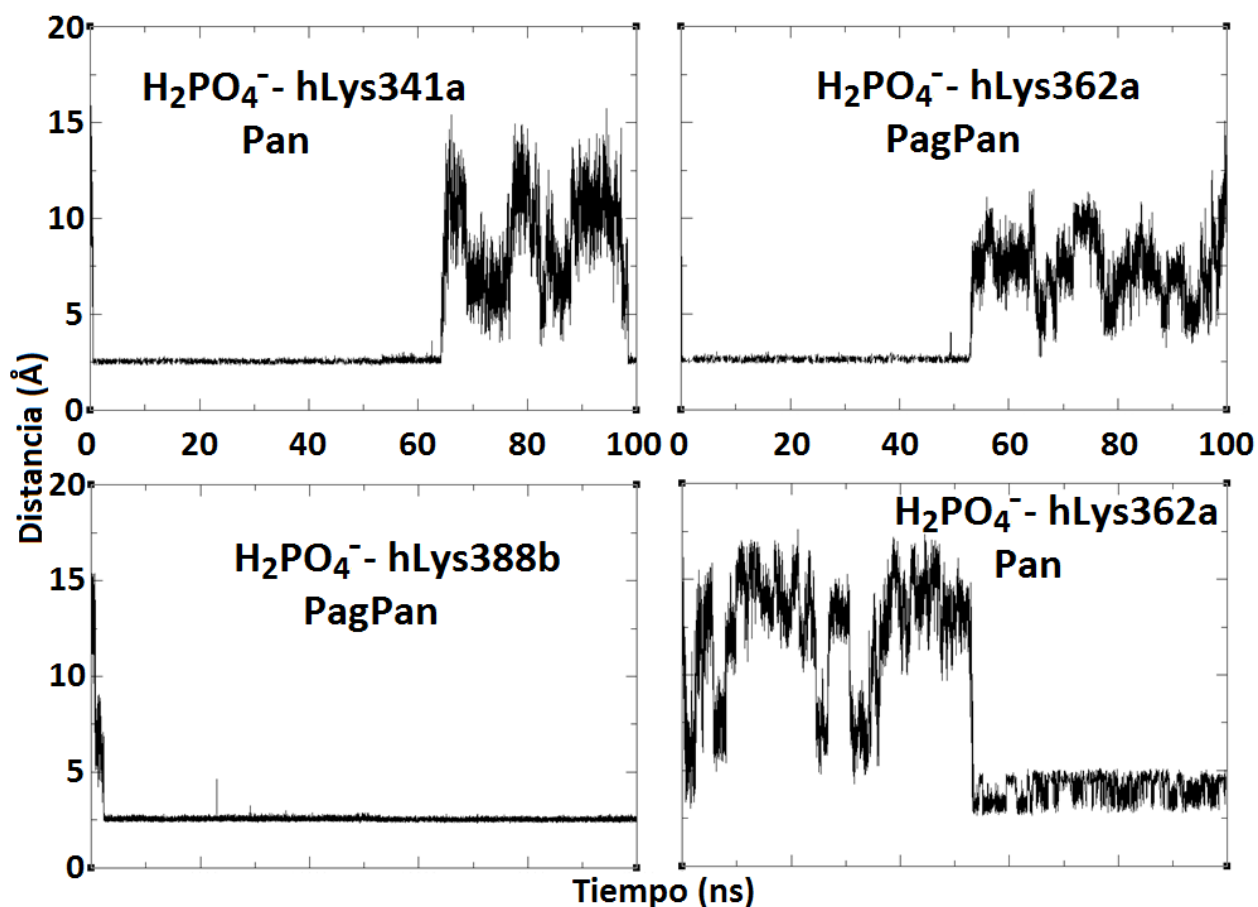


Figura A16. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) y los residuos del *Wedge* dimérico humano (h[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P], modelo No. 3 en **Tabla 5**). Ninguna sonda muestra preferencia por el sitio Pan. En los gráficos de la izquierda, nuevamente se observa que un residuo (hLys362a) puede interactuar con un grupo fosfato inicialmente e interactuar con otro después. Así mismo, el fosfato en posición inicial Pan interactúa inicialmente con el residuo hLys341a y después con hLys362a. Este tipo de interacciones se lograron en base a las simulaciones iniciales. El residuo hLys388b parece ser fundamental para la activación del complejo receptor, apoyado en el estudio de acoplamiento molecular ligando-receptor. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

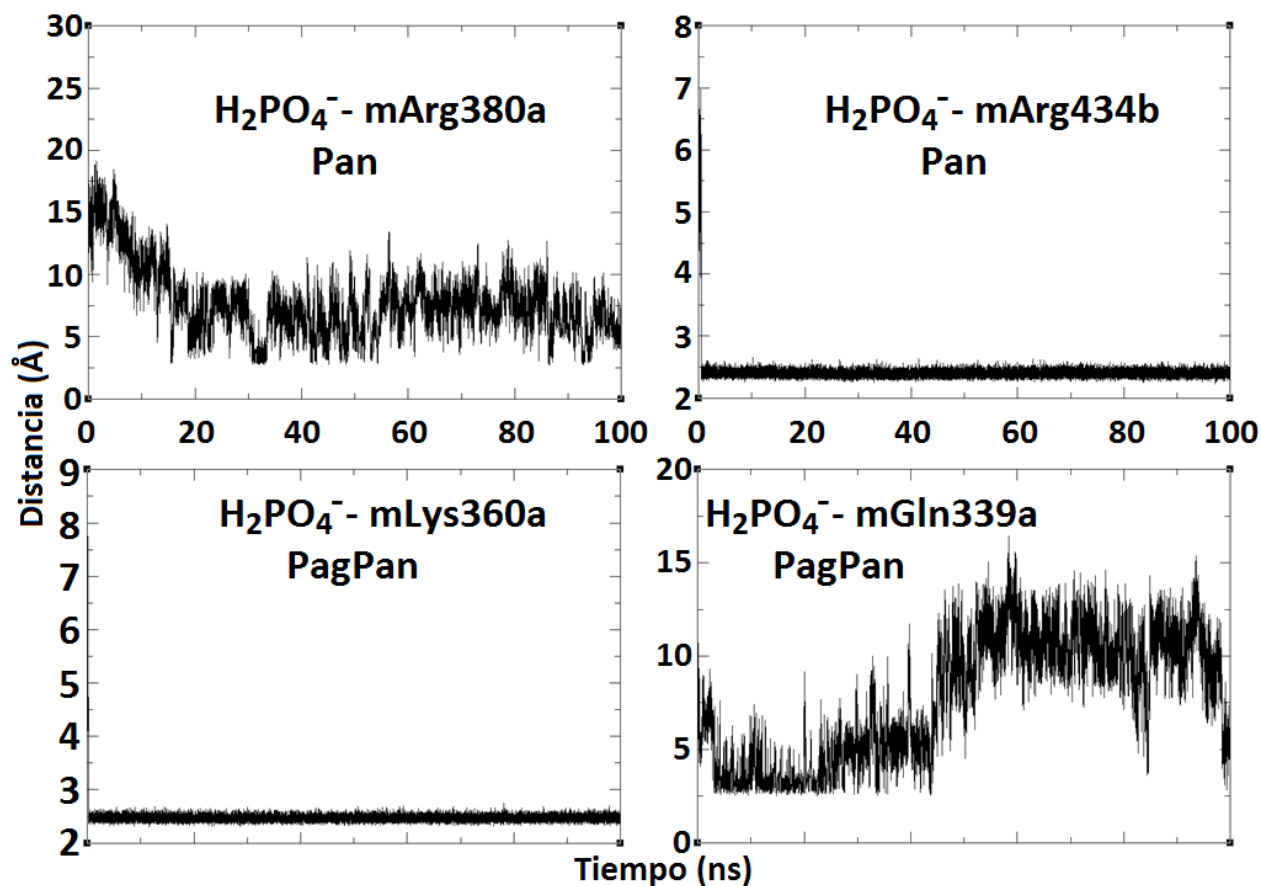


Figura A17. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) y los residuos del *Wedge* dimérico murino (m[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P], modelo No. 1 en **Tabla 5**). En este caso, los residuos mArg380a y mArg434b no forman parte del *Wedge* por lo que se considera que no se cumple la expectativa. Aunque el residuo mGln339a es próximo al sitio PagPan, pero no forma parte del *Wedge*. Ninguna sonda muestra preferencia por el sitio Pan. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

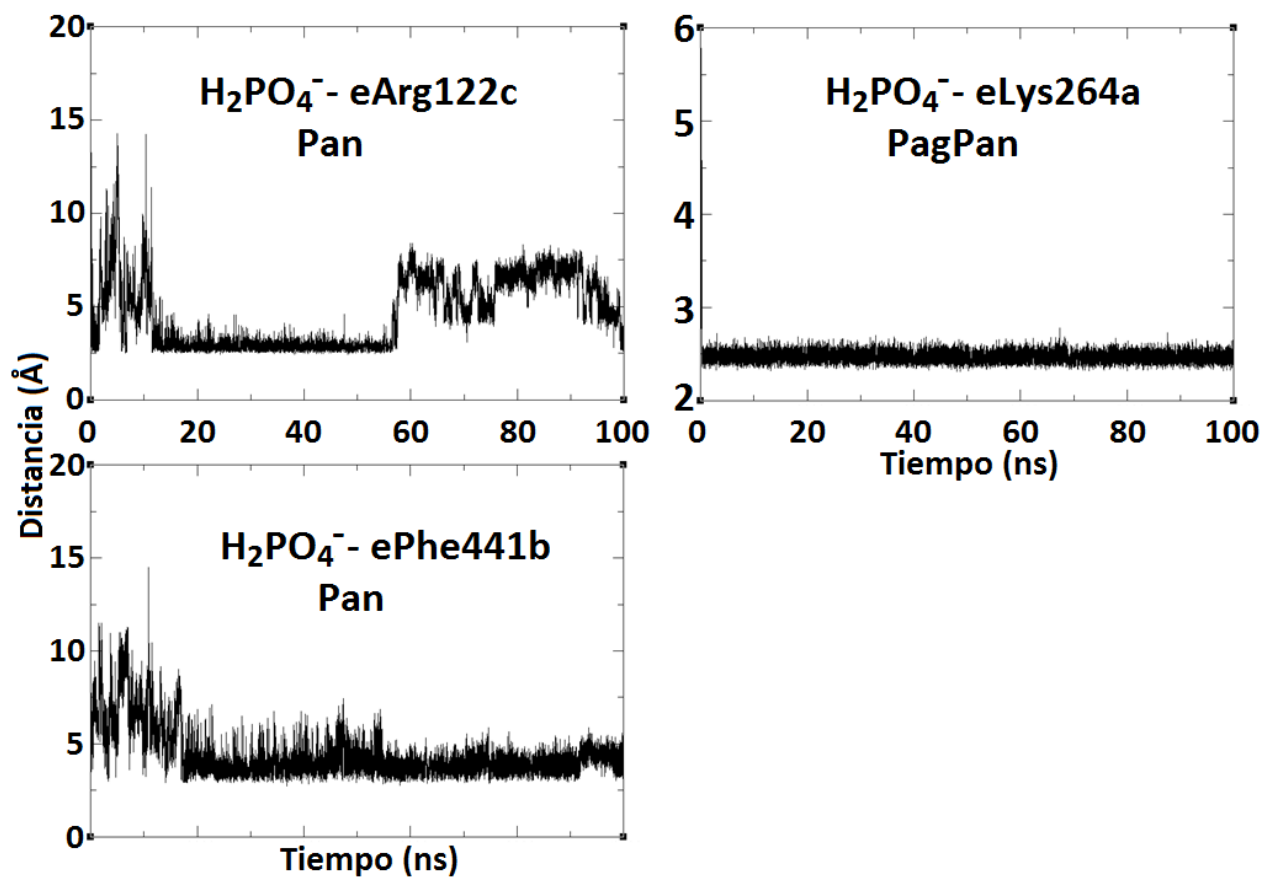


Figura A18. Gráficos de distancia de interacción (eje y , Å) vs tiempo (eje x , ns) entre el grupo fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) y los residuos del *Wedge* dimérico equino (e[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P], modelo No. 2 en **Tabla 5**). El fosfato en posición inicial Pan interactúa con el residuo ePhe441b fuera del *Wedge*, a la vez que interactúa con eArg122c. Aunque este último residuo es parte del sitio Pag, el fosfato no se mueve por esta zona, ya que el residuo mueve su cadena lateral a un sitio cercano al sitio Pan (**Figura 22**, izquierda abajo). Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

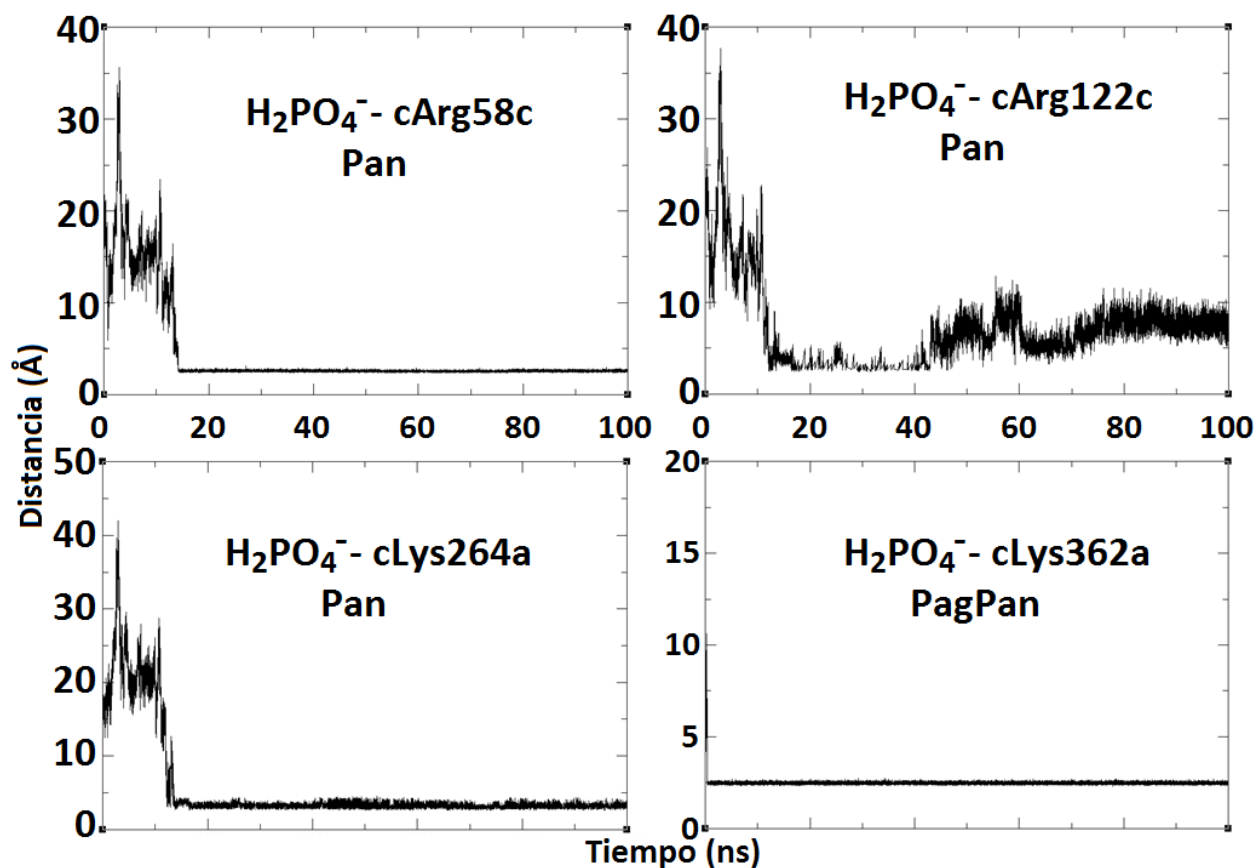


Figura A19. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) y los residuos del *Wedge* dimérico canino (c[shortTLR4*/TLR4/MD-2/2P], modelo No. 4 en **Tabla 5**). Los residuos cArg58c y cArg122c mantienen al fosfato en posición inicial Pan en el sitio Pag. Aunque en la **Figura 22** (derecha abajo) la preferencia puede parecer difusa, no se observa preferencia por el sitio Pan. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

Las distancias de interacción en función del tiempo, entre los grupos fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) y los residuos del *Wedge* monomérico ([TLR4/MD-2/2P]) de las cuatro especies, se muestran en la **Figura A20**, **Figura A21**, **Figura A22** y **Figura A23**.

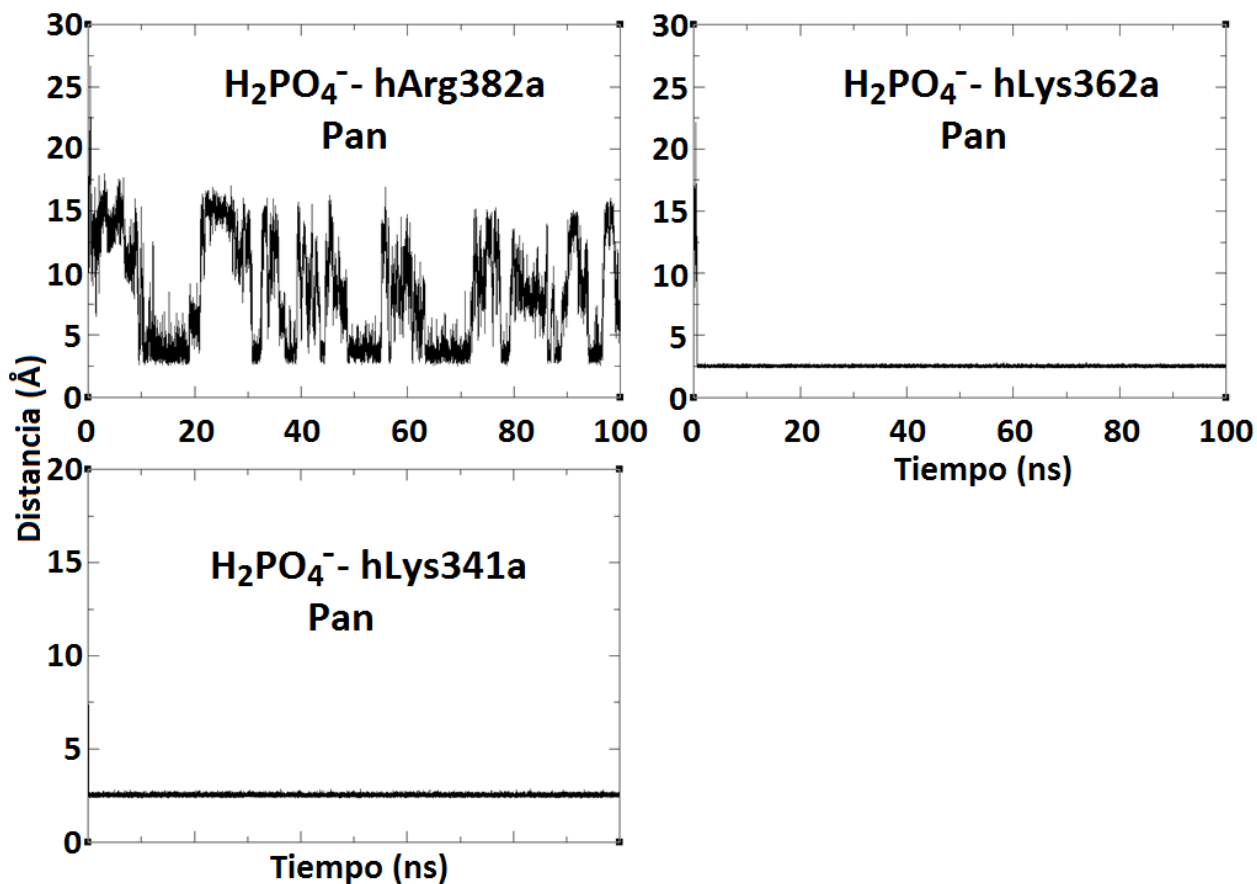


Figura A20. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) y los residuos del *Wedge* monomérico humano (h[TLR4/MD-2/2P], modelo No. 5 en **Tabla 5**). A pesar de que el TLR4* no está presente, hay clara tendencia hacia la posición agonista, particularmente con los residuos hLys341a y hArg382a del sitio Pag. Los grupos fosfato no interactúan con residuos del sitio Pan. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

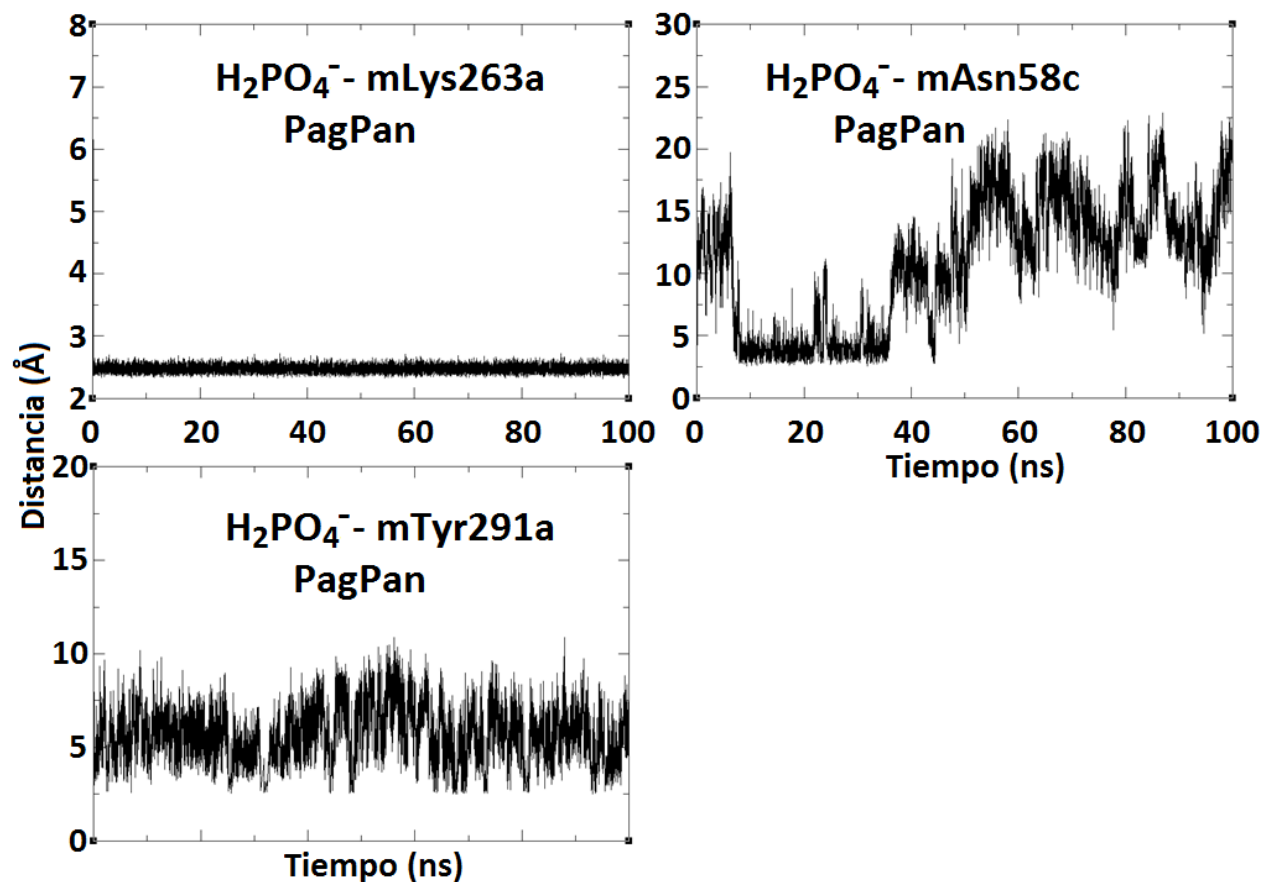


Figura A21. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) y los residuos del *Wedge* monomérico murino (m[TLR4/MD-2/2P], modelo No. 7 en **Tabla 5**). El fosfato en posición inicial Pan sale del *Wedge* desde el inicio de la simulación. La interacción fundamental en este caso de la sonda en posición inicial PagPan es con el residuo mLys263a, ya que el residuo mTry291a no es parte del *Wedge* y mAsn58c no pertenece a este sitio. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

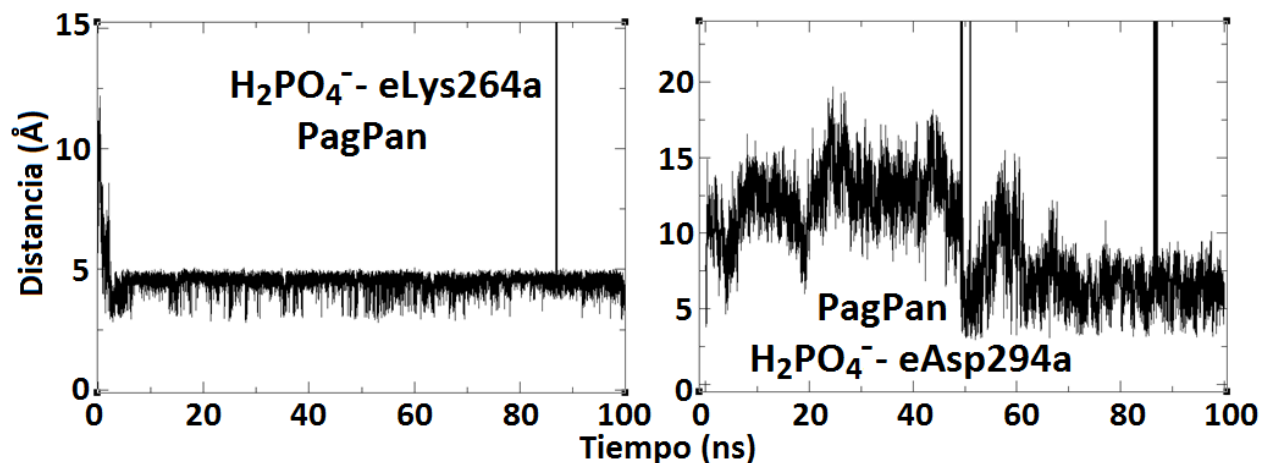


Figura A22. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) y los residuos del *Wedge* monomérico equino (e[TLR4/MD-2/2P], modelo No. 8 en **Tabla 5**). Ninguna sonda muestra preferencia por los sitios Pag y Pan. El residuo eAsp294a no forma parte del *Wedge*. La sonda en posición inicial Pan salió del *Wedge*. Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

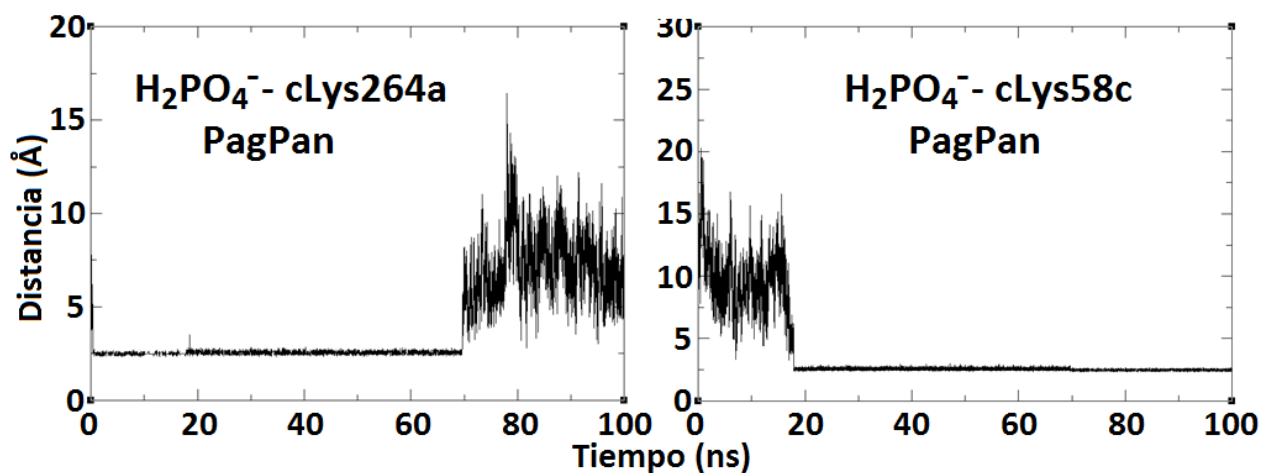


Figura A23. Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre el grupo fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pag y PagPan) y los residuos del *Wedge* monomérico canino (c[TLR4/MD-2/2P], modelo No. 6 en **Tabla 5**). Ninguna sonda muestra preferencia por los sitios Pag o Pan. La sonda en posición inicial Pan salió del *Wedge*. El residuo cLys58c forma parte del sitio Pag, pero su cadena lateral puede moverse prácticamente hacia el sitio PagPan, similar a la simulación anterior de la misma especie (con fosfatos en posición inicial agonista). Debajo de cada interacción señalada en cada gráfico, se muestra la posición inicial de la sonda.

A8. Dinámica molecular con el TLR4 contrario (TLR4*)

Se realizó una simulación MD únicamente con el TLR4* humano (formalmente idéntico al TLR4) bajo las mismas condiciones (NPT, 310 K, 100 ns). Esta subunidad tiene dos residuos críticos para ligandos agonistas como el LA: hLys388b y hGlu369b, cuya interacción mutua podría tener un efecto repulsivo evitando la dimerización y activación del complejo receptor. En la **Figura A24**, se muestra que estos dos residuos tienen la posibilidad de interactuar al colocar sus cadenas laterales a menos de 3 Å durante una simulación de 100 ns. El residuo hLys388b mostró interacciones cruciales en las simulaciones MD presentadas con anterioridad, pues los fosfatos mostraron clara preferencia por este residuo. Si bien en esta simulación no hay un estudio del efecto especie-específico, la interacción entre estos dos residuos señala una menor tendencia a la activación en la especie humana, la cual estaría mediada por ligandos con características particulares. La neutralización de ambos residuos no permitiría una óptima interacción con los fosfatos de derivados del LPS, lo cual evitaría la activación.

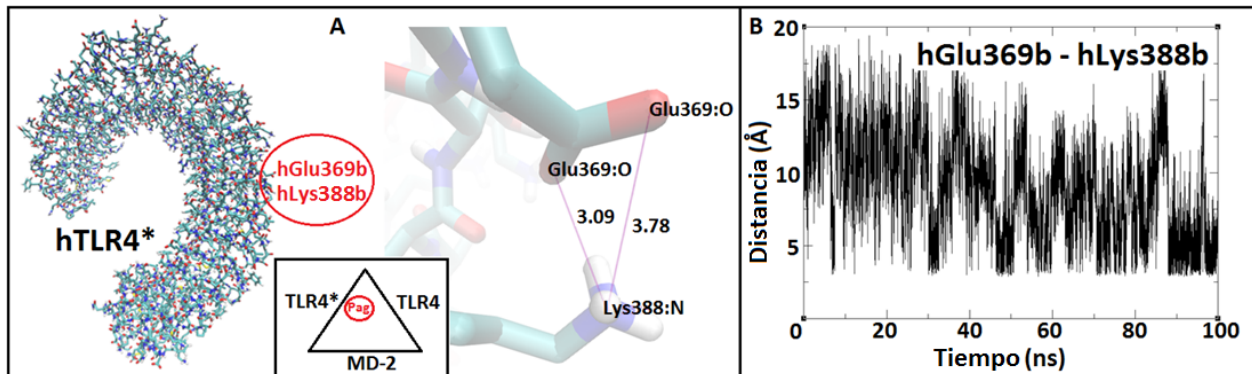


Figura A24. Interacción por dinámica molecular de los residuos hGlu369b y hLys388b del TLR4 contrario de la especie humana (hTLR4*). **B.** Gráficos de distancia de interacción (eje y, Å) vs tiempo (eje x, ns) entre ambos residuos durante la simulación. Las distancias observadas en el transcurso de la simulación indican que ambos residuos pueden interactuar, evitando la dimerización y activación del complejo receptor.

A9. Análisis del estado de ionización de los residuos del *Wedge* por dinámica molecular

Una desventaja al utilizar dinámica molecular en sistemas biológicos, es que las propiedades de todos los residuos aminoacídicos son las mismas para toda la proteína. Esto es entendible en términos matemáticos ya que el generar estructuras aminoacídicas diferenciales haría aún más complejo y posiblemente más tardado un cálculo mediante MD. Lo anterior, fue lo que motivó a modificar manualmente las cargas de los residuos de arginina y lisina del *Wedge*, pues de otra forma el uso de una sonda (en este caso el grupo fosfato) no tendría sentido bajo las condiciones “igualitarias” de las simulaciones MD.

Aunque los resultados antes mostrados no arrojaron comportamientos especie-específicos, es notable que las interacciones con residuos ácidos no es frecuente, lo cual en parte se entiende por el carácter aniónico tanto de los residuos como de la sonda. Sin embargo, existen reportes sobre la interacción de aniones en simulaciones computacionales [A11,A12], las cuales se dan principalmente por puentes de hidrógeno. La interacción del fosfato con residuos de ácido glutámico y aspártico, se da de forma ineficiente, pues en dinámica molecular son considerados y parametrizados como ionizados (aniónicos) por lo que la magnitud de carga negativa es mayor en un oxígeno de estos residuos. También es conocido que el microambiente que rodea a un aminoácido puede alterar su estado de ionización.

Por lo anterior, y como una forma de evaluar las interacciones anión-anión, el residuo hGlu439b del sitio Pan del *Wedge* humano fue cambiado por glutamina tratando de emular una condición de carga neutral. Hay que señalar que en los programas de MD utilizados aquí, no existe la opción de protonar, neutralizar o cambiar el estado de ionización de ningún residuo (por cuestiones de compatibilidad y consistencia con el programa), por lo que se recurrió a un cambio de aminoácido por otro que tiene características similares en estado neutro. La razón de modificar este residuo en particular, se debe a que el L4a en humano, coloca uno de los fosfatos (P2) en el sitio Pan. Pero se debe recordar que en ese caso (antagonismo), el TRL4* no estaría presente, así que se trata de generar una situación “artificial” y a pesar de eso, observar bajo estas condiciones si se da la interacción planteada (**Figura A25**).

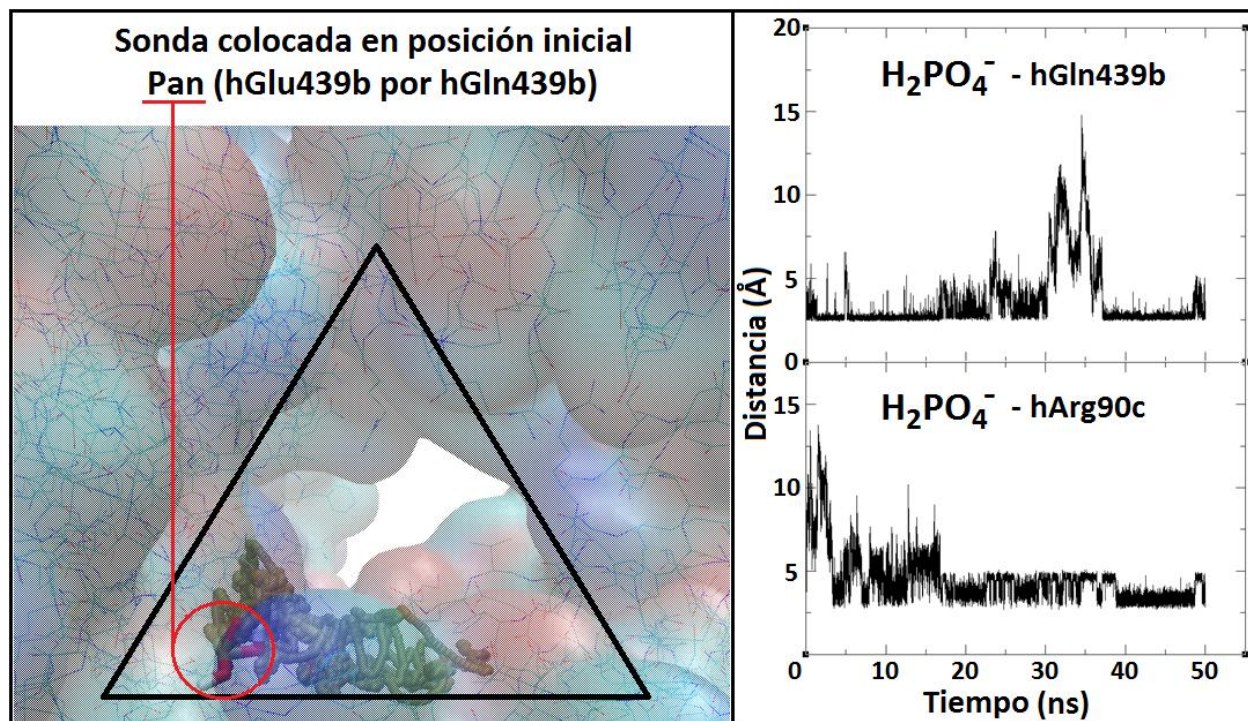


Figura A25. Preferencia posicional de la sonda fosfato dentro del *Wedge* humano con el residuo hGlu439b cambiado (neutralizado) por hGln439b. **Izquierda.** Posición inicial de la sonda en el sitio Pan y trayectoria dentro del *Wedge* humano (línea trazada en la parte inferior izquierda del *Wedge*, que es el trayecto que sigue el grupo fosfato desde su posición inicial, señalada en el círculo rojo). **Derecha.** Distancias de interacción (Å, eje y) en función del tiempo (ns, eje x) entre la sonda y residuos del sitio Pan del *Wedge*. Gráfica superior. Distancia de la sonda en función del tiempo con el residuo hGln439b. Gráfica inferior. Distancia de la sonda en función del tiempo con el residuo hArg90c.

Referencias (Apéndice)

- A1. Benjamin I. 1997. Molecular structure and dynamics at liquid-liquid interfaces. *Annual Reviews of Physical Chemistry*, 48:407-451.
- A2. Michael D, Benjamin I. 2001. Molecular dynamics computer simulations of solvation dynamics at liquid/liquid interfaces. *The Journal of Chemical Physics*, 114(6):2817-2824.
- A3. Bruice P Y. Organic Chemistry. 2006. Apéndice II. *Prentice Hall*; 5th edition.
- A4. Malmberg D G, Maryott A A. 1956. Dielectric Constant of Water from 0° to 100 °C. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 56(1):1-8;
- A5. Uematsu M, Franck E U. 1980. Static dielectric constant of water and steam. *The Journal of Physical Chemistry*, 9(4):1291-1306.
- A6. Lang S, Kazdal T J, Kühl F, Hampe M J. 2014. Diffusion coefficients and VLE data of aqueous phosphoric acid. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 68:75-81.
- A7. Alpbaz M, Bilgesu A, Tutkun O. 1988. The measurement of interfacial tension by Drop-weight method. *Communications de la Faculte des Sciences de l'Universite d'Ankara. Series B*, 34:103-112.
- A8. Mendoza F N, López-Lemus J, Chapela G A, Alejandro J. 2008. The Wolf method applied to the liquid-vapor interface of water. *The Journal of Chemical Physics*, 129(2):024706.
- A9. Shafkat A. Beg, Nasiru M. Tukur, Dulaihan K. Al-Harbi, and Esam Z. Hamad. 1993. Saturated Liquid Densities of Benzene, Cyclohexane, and Hexane from 298.15 to 473.15 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 38:461-464.
- A10. Schüttelkopf A W, van Aalten D M F. 2004. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 60:1355-1363.
- A11. Lee S, Chen C H, Flood A H. 2013. A pentagonal cyanostar macrocycle with cyanostilbene CH donors binds anions and forms dialkylphosphate [3]rotaxanes. *Nature Chemistry*, 5:704-710.
- A12. Fatila E M, Twum E B, Sengupta A, Pink M, Karty J A, Raghavachari K, Flood A H. 2016. Anions Stabilize Each Other inside Macrocyclic Hosts. *Angewandte Chemie International Edition*, 55:14057-14062.

Índice de Figuras

Figura 1. Activación de la Respuesta inmune innata mediada por LPS en Macrófagos.	3
Figura 2. Arquitectura de la pared celular de bacterias Gram-negativas.	4
Figura 3. Estructura química general del LPS de bacterias Gram-negativas.	5
Figura 4. Estructura molecular del LA del LPS, su precursor L4a, y del inhibidor Eritoran.	6
Figura 5. Representación 3D del complejo monomérico no activado [TLR4/MD-2] y dimérico activado [TLR4/MD-2/LPS] ₂ en forma de “m”.	7
Figura 6. Representación 3D de las conformaciones agonista y antagonista del L4a.	8
Figura 7. Modelo de interacción en forma de cuña o <i>Wedge</i> , (derecha) propuesto para el LPS y sus derivados.	9
Figura 8. Simulaciones por dinámica molecular.	11
Figura 9. Detalles del diseño de este trabajo de investigación que refleja la justificación.	13
Figura 10. Esquema de trabajo.	16
Figura 11. Adecuación del modelo del <i>Wedge</i> .	18
Figura 12. MSA de los TLR4 de las cuatro especies analizadas en este trabajo.	23
Figura 13. MSA de los MD-2 de las cuatro especies analizadas en este trabajo.	24
Figura 14. Modelo 3D del complejo receptor canino modelado por homología.	25
Figura 15. Modelos de interacción propuestos para el L4a.	25
Figura 16. Gráficos de distancia de interacción vs tiempo entre el grupo fosfato y los residuos del sitio PagPan del <i>Wedge</i> de la especie humana generados por dinámica molecular.	27
Figura 17. Preferencias posicionales de la sonda en experimentos iniciales.	29
Figura 18. Vista esquemática de las preferencias posicionales esperadas para las sondas dentro del <i>Wedge</i> de forma especie-específica.	32
Figura 19. Preferencias posicionales de los grupos fosfato en posición inicial agonista dentro del <i>Wedge</i> .	33
Figura 20. Gráficos de distancia de interacción vs tiempo de simulación entre los grupos fosfato (posición inicial agonista) y los residuos del <i>Wedge</i> .	35

Figura 21. Preferencias posicionales de los grupos fosfato en posición inicial agonista dentro del <i>Wedge</i>	36
Figura 22. Preferencias posicionales de los grupos fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) dentro del <i>Wedge</i>	38
Figura 23. Preferencias posicionales de los grupos fosfato en posición inicial antagonista (sitios Pan y PagPan) dentro del <i>Wedge</i>	40
Figura 24. Mapas de potencial de interacción generados al rededor del L4a dentro del <i>Wedge</i> para humano (h), murino (m), equino (e) y canino (c).	42
Figura 25. Mapas de potencial de interacción de la sonda fosfato dentro del <i>Wedge</i> para las especies humana (h) y murina (m).	44
Figura 26. Mapas de potencial de interacción de la sonda fosfato dentro del <i>Wedge</i> para las especies equina (e) y canina (c).	45
Figura 27. Vista de la superficie del <i>Wedge</i> natural humano (razonable) sin el TLR4*.	46
Figura 28. Vista de la superficie del <i>Wedge</i> artificial humano (no razonable) con el TLR4*	47
Figura 29. Vista de la superficie del <i>Wedge</i> natural murino (razonable) con el TLR4*.	48
Figura 30. Adecuaciones al <i>Wedge</i> de las especies humana, canina, equina, y murina.	51
Figura 31. Acoplamiento molecular automático entre el LA y la proteína de unión a LPS (LBP).	53
Figura 32. Acoplamiento molecular entre el LA y la proteína LBP restringido al sitio de unión reportado.	54

Índice de Tablas

Tabla 1. Actividades biológicas observadas y estructuras cristalizadas reportadas con LPS y/o derivados asociados al complejo receptor TLR4/MD-2.	21
Tabla 2. Porcentajes de identidad del TLR4 de las cuatro especies a estudiar obtenidos por MSA con <i>ClustalW</i>	23
Tabla 3. Porcentajes de identidad del MD-2 de las cuatro especies a estudiar obtenidos por MSA con <i>ClustalW</i>	24
Tabla 4. Preferencias posicionales de la sonda en simulaciones MD iniciales.	30
Tabla 5. Listado sistemático de los ocho modelos de los <i>Wedges</i> generados para MD y su relación con la actividad reportada.	31
Tabla 6. Efectos esperado y simulado (preferencias posicionales) de los dos fosfatos en posición inicial agonista dentro del <i>Wedge</i> en el receptor dimérico ([shortTLR4*/TLR4/MD-2]).	34
Tabla 7. Efectos esperado y simulado (preferencias posicionales) de los dos fosfatos en posición inicial agonista dentro del <i>Wedge</i> en el receptor monomérico ([TLR4/MD-2]).	37
Tabla 8. Efectos esperado y simulado (preferencias posicionales) de los dos fosfatos en posición inicial antagonista dentro del <i>Wedge</i> en el receptor dimérico ([shortTLR4*/TLR4/MD-2]).	39
Tabla 9. Efectos esperado y simulado (preferencias posicionales) de los dos fosfatos en posición inicial antagonista dentro del <i>Wedge</i> en el receptor monomérico ([TLR4/MD-2]).	41
Tabla 10. Contribuciones diferenciales de carga neta en los sitios Pag y Pan para las cuatro especies de los residuos en el <i>Wedge</i> monomérico (“>”) o dimérico (“Δ”).	50