



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Licenciatura en Ciencias: Área terminal en Bioquímica y Biología Molecular

Identificación *in silico* de Interacciones de Péptidos Antimicrobianos con
Receptores Inmunitarios

T E S I S

QUE PRESENTA:

ANDRID LÓPEZ CLAVIJO

Para obtener el Grado de

LICENCIADO EN CIENCIAS

Director de Tesis:

M. C. Marco Antonio Ibarra Valencia

Instituto de Biotecnología de la UNAM

Sinodales:

- **Presidente.** Dra. Carmen Nina Pastor Colón
- **Secretario.** Dra. María Angélica Santana Calderón
- **Suplente 1.** Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez
- **Suplente 2.** Dr. Ramón Antonio González García-Conde



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el C. **LÓPEZ CLAVIJO ANDRID** con número de matrícula **20154006447** cuyo título es:

“Identificación in silico de Interacciones de Péptidos Antimicrobianos con Receptores Inmunitarios”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**.

Cuernavaca, Mor a 02 de junio del 2021

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN
DRA. ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN
M EN C. MARCO ANTONIO IBARRA
DR. IVÁN MARTINEZ-DUNCKER RAMÍREZ
DR. RAMÓN GONZÁLEZ GARCÍA CONDE

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2021-06-02 10:51:12 | Firmante

X1fBiVRppcPiNEeSMUJ5faEnL9ELJ629XP1Cu5gsTBU9taJvat9g+Vzn9cFhghmFMSSAdf4ZGL82MNz0GNcyBFfIsh0doD73nHj/KJKJFOAEyGz3tcjwJh2lsRFFcla9CQm/Qt1op6Vf5zjh5EijiriW5P86ONMWLeApHX2HhhXQgpmniCx0n1HGyuf1bS3c255QrWRnor8rfWqYc0xYgppj9ZlhbEj1g6kpUNY9p1/9pQRqjbtC45lguDnTDKAAcY2C7zEquetNeRZ4ZdFt8ce3PBMJwXeCafJLOmlqSWRjgfcE5JyfwmEgRj6iZQ7nqCc6HJkDVABYQfEzARVRg==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2021-06-02 13:21:21 | Firmante

brzLmwwl07zCRUIUbfzYvYKjLpwch4d0BIVGtUetBJlQn1YyvPAolxccc6PRVslW6JQ0vh9H5FzFim/tcABpvSdRXPWz2WgeycUfAgTMQo1UESaQoJJCmju/xFIYTBVdyZz9TdRowZ X8rWhiYGrSyeT68dQSCxtlYMCArp3uYjYE9UfRd3N321DMiee10TtTob7lgc+P4pk9nzBulzaj71YZNF9O9j/IRBF1brdkpcqD6bjKOGvrtUa+excREFsnF6NAj+1qrEoDN5MJamxJb3uGd8UpfPgwWCReQXAgE4bF7TSM2K1nd+N635Kcy1G8jH4v+1QQHrHjxKVz6F3AQ==

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2021-06-02 15:44:59 | Firmante

cwMppZn4jUE02i5yJX1Jpxr3ACeXYLQN4TDglA20X8thbucpirx2ulMlu8J4yhw77aMD77UNmgaydFTzIDWsvukwJXsAKHqg/yr2Xi4sfrKJ/udl9+1kYyfAYwe8O7qIk2y+sG4RtQ7q1kpyw09oJZTPQ8OBYu92PqJ7T1JLcKswfQXlZyXl667IORvm5i8cxE+PsZOFUYwTzyJhH9srIMKXahDBUTDxVpiO25yXCAjFpYViPMPHPGldTV9i9DVfv46u07NDAccsZx2j+qIkU8eJyegXNdZ2SmtMKINPModRslaVffPFvwx9DP9Vg9SoAh9oytWF8Ov2bKIK+0A==

MARCO ANTONIO IBARRA VALENCIA | Fecha:2021-06-02 20:57:47 | Firmante

CzF01F47Sf12jKTDGoOulfeW8OIq0SBU77XMXMMAevaQfU1d5MgGah7CJmnF/RQitW44/d9pTG3/43dfmU7pl2OzJpjMMS7JjBEndCM8+Nthx7M8S7PEWBKZLsHjn+llkw9I5Pj4hYfkBG1O0cp9qY7HMLwS786iQ5er+7Be5VAiktB6SiO1j7SBmvxRVVAhlyl6KWRBnuVTPjZj1MkKjz38Ku8zMhp9a5ZVNGFBpmitfKbMmXEInK3/Dx+dYyjEqRV+veGTacdpCUUnkRoM399jEHVUGU6KkfT5f3N6Tk4SLBPokxVckVHepijT20jRwUZmIFTlu9CmpgQJSA==

IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2021-06-04 20:17:31 | Firmante

UBJl3UVI8+WURmZ1VcuOCw3qBSF5gookZrF9yppYKNr6n5GzG9A4i5JVQoAakYwjd8TIDfDHzGY2vNydv+nnXnTRoj0BOmwrTnOAIpd9wwIXIABxKBcirrCLTSjGRdW2IXN1sq0GZgPzbcvTOTpQ5Vj9tRavrljtEWfku6uRcyTr1hUNxvxt0LZphQVF4eX/PxI9ffyhSA5alyISBryyJx1akMRvdX3+rAZPOvtvd4LqQ7xUZTaUZZ+L5ydu/k/aeErMrT+K6xrp5O2qS1ATsqgtT6P1p7Phl7R6sjvMdvY2pKEZ/S0gCfXoj2/cQjhfgA6OjQxpbDe/5I4vBVTfW==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



lw7tin

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ggcwNLC5YQrh2kCqGoNhMENMvmjmb30s>



Agradecimientos

A Marco, el director de tesis por la ayuda y toda la retroalimentación para mejorar el trabajo.

Al doctor Corzo por permitirme trabajar en su equipo.

A Andrei, por ayudar a esclarecer las ideas de cosas que aún no entendía.

Al equipo de péptidos antimicrobianos: Marco, Astrid, Marce, Odalis, Erika y Memo.

Dedicatoria

A mi madre, que le agradezco por todos los esfuerzos que ha hecho para que siga estudiando, las noches de desvelo por cuidar mí, y por todo lo demás.

A mi hermana y mi sobrina.

Índice

Abreviaciones	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
1 Introducción	1
1.1 Inmunidad innata	1
1.2 Quimiocinas	2
1.2.1 MCP-1 y CCR2	2
1.3 Péptidos antimicrobianos y péptidos de defensa del hospedero.	3
1.4 Mecanismos de acción de los HDPs	6
1.5 Defensinas	7
1.6 Papel de la estructura tridimensional en el efecto inmunomodulador	9
1.7 Modelado de péptidos	9
1.7.1 Modelado de novo	9
1.7.2 Modelado por homología	10
1.8 Acoplamiento molecular	12
2 Antecedentes	14
2.1 Beta defensina humana 3	14
2.2 Unión de ligandos a CCR2	14
3 Hipótesis	16
4 Justificación	16
5 Objetivos	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos particulares	16
6 Material y métodos	17

6.1	Esquema de trabajo	17
6.2	Herramientas	18
6.2.1	BLAST	18
6.2.2	T-COFFEE	18
6.2.3	MODELLER	18
6.2.4	PROCHECK	19
6.2.5	ERRAT	19
6.2.6	ProFit	19
6.2.7	GROMACS y Charmm36m	20
6.2.8	ClusPro	20
6.2.9	Prodigy	20
6.2.10	g_mmpbsa	21
6.2.11	HADDOCK	21
6.2.12	CoCoMaps	22
6.2.13	FiberDock	22
6.2.14	PyMOL	23
6.2.15	RING 2.0	23
6.3	Metodología de modelado	23
6.3.2	Selección de los modelos	25
6.3.3	Minimización de los modelos	26
6.4	Metodología del acoplamiento molecular	27
6.4.1	Condiciones de acoplamiento molecular	27
6.4.2	Identificación de residuos activos en la unión	27
6.4.3	Reacoplamiento molecular e identificación de poses	27
7	Resultados	29

7.1	Modelado por homología	29
7.2	Refinamiento de asas	31
7.3	Minimización de energía	32
7.4	Acoplamiento molecular	39
7.4.1	Mapas de incidencia de contactos	39
7.4.2	Aportaciones energéticas	43
7.5	Reacoplamiento	51
7.6	Complejos proteína-péptido del reacoplamiento con <i>HADDOCK</i>	57
7.7	Comparación de complejos	66
8	Discusión	69
9	Conclusiones	78
10	Perspectivas	79
11	Referencias	80
	Anexo I	84
	Anexo II	90

Índice de figuras

Figura 1. Diversidad estructural de los péptidos antimicrobianos.....	4
Figura 2. Formación de poros y blancos intracelulares	5
Figura 3. Secuencia y enlaces di sulfuro de las defensinas alfa, beta y teta	7
Figura 4. Diagrama representativo de CCR2.....	15
Figura 5. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de CCR2 y CCR5.....	25
Figura 6. Incidencia de valores DOPE y RMSD	29
Figura 7. Modelos generados por homología	30
Figura 8. Refinamiento de asas.....	31
Figura 9. Cambios de energía en los modelos generados por homología	33
Figura 10. Evaluación ERRAT y gráficos de ramachandran de HBD3M	34
Figura 11. Evaluación ERRAT de los modelos para CCR2.....	35
Figura 12. Gráficos de Ramachandran de los modelos para CCR2.....	36
Figura 13. Minimización de energía del modelo para hBD3M	37
Figura 14. Minimización de energía del modelo para CCR2	38
Figura 15. Mapas de incidencia de contactos, suma global y local	40
Figura 16. Mapas de incidencias de contactos individuales	42
Figura 17. Aportaciones energéticas de CCR2 al complejo CCR2xCCL2.....	43
Figura 18. Aportaciones energéticas de CCR2 al complejo CCR2xhBD6.....	44
Figura 19. Aportaciones energéticas de CCR2 al complejo CCR2xhBD3.....	45
Figura 20. Aportaciones energéticas de CCR2 al complejo CCR2xhBD3M.....	46
Figura 21. Aportaciones energéticas de CCL2 al complejo CCR2xCCL2	48
Figura 22. Aportaciones energéticas de hBD6 al complejo CCR2xhBD6.....	48
Figura 23. Aportaciones energéticas de hBD3 al complejo CCR2xhBD3.....	49
Figura 24. Aportaciones energéticas de hBD3M al complejo CCR2xhBD3M.....	49
Figura 25. Características electrostáticas de CCR2	57
Figura 26. Características electrostáticas de los ligandos.....	58
Figura 27. Ligandos sobre el receptor	60
Figura 28. Ligandos sobre el receptor (cont)	61
Figura 29. Contactos entre CCR2 y CCL2.....	62
Figura 30. Contactos entre CCR2 y hBD6.....	63

Figura 31. Contactos entre CCR2 y hBD3.....	64
Figura 32. Contactos entre CCR2 y hBD3M.....	65
Figura 33. Aportaciones energéticas residuo por residuo de los complejos finales	66
Figura 34. Comparación de acoplamiento de CCL2.....	67
Figura 35. Comparación de acoplamiento con hBD6	68

Índice de tablas

Tabla 1. Topología de CCR2	15
Tabla 2. Búsqueda de plantillas por NCBI BLAST de proteínas	24
Tabla 3. Interacciones entre hBD6 y CCR2	27
Tabla 4. Selección de modelos generados por homología	30
Tabla 5. RMSD de cadena lateral y principal después de la minimización de energía	32
Tabla 6. Nomenclatura para acoplamiento con ClusPro	39
Tabla 7. Residuos de CCR2 con mayor contribución energética a los complejos con los ligandos	47
Tabla 8. Residuos de los ligandos con mayor contribución energética a los complejos	50
Tabla 9. Residuos utilizados como activos y pasivos en el reacoplamiento con HADDOCK	53
Tabla 10. Resultados de reacoplamiento 1 con HADDOCK.	54
Tabla 11. Resultados de reacoplamiento 2 con HADDOCK.	55
Tabla 12. Energías HADDOCK y contactos con la región DYDY del receptor	56
Tabla 13. Energías de los complejos según HADDOCK y FiberDock	59

Abreviaciones

AMPs = Péptidos antimicrobianos

HDPs = Péptidos de defensa del huésped

IDRs = Reguladores de la defensa inmune

hBD3 = Beta defensina humana 3

HBD3M = Beta defensina humana 3 recombinante

CCL2 = Quimiocina ligando 2 con motivo C-C

CCR2 = Receptor de CCL2

hBD6 = Beta defensina humana 6

GPCR = Receptor acoplado a proteína G

PDB = Protein Data Bank

Glo = Global

Rep = Repulsión

Atrep = Atracción/repulsión

Resumen

Los AMPs y de HDPs son parte fundamental del sistema inmune innato, se encuentran principalmente en tejido expuesto a patógenos, pueden destruir las membranas bacterianas e intervenir en funciones vitales de la célula, anteriormente se creía que esta era su actividad principal, sin embargo, se ha encontrado que algunos pueden intervenir en la respuesta inmune, promoviendo la producción de citosinas, quimiocinas, así promoviendo la inflamación y el movimiento de otras células inmunes. Esta actividad podría ser activa por unión de estos péptidos a receptores presentes en células del sistema inmune.

La hBD3M es un péptido recombinante derivado de la hBD3, que además de tener actividad antimicrobiana puede promover el movimiento de monocitos a través del receptor de citocinas CCR2, un receptor acoplado a proteína G. hBD3M también ha mostrado promover la cicatrización de heridas subcutáneas. Para entender la unión de hBD3M a CCR2 se hizo modelado por homología con el programa *MODELLER* y acoplamiento molecular péptido-proteína empleando los servidores *ClusPro* para acoplamiento global y *HADDOCK* para acoplamiento local.

Con los acoplamientos se encontró que la unión se da en una cavidad formada por las regiones extracelulares del receptor, y que la región DYDY del receptor aporta energía libre favorable a la unión de ligandos. Algo que favorece a la unión de hBD3M con CCR2 es la cationicidad del péptido, teniendo una mayor superficie con cargas electrostáticas positivas que los demás ligando. Una diferencia clara con la hBD3 es que la cola de histidinas podría restringir la orientación con la que se une el péptido, habiendo un mayor contacto con el N-terminal de receptor que con las demás regiones que forman la cavidad, también se pudo observar que la unión se ve mayormente favorecida por interacciones de van der Waals, similar a hBD3. Con estos métodos *in silico* se pudo obtener un acercamiento al comportamiento del péptido hBD3M en la unión al receptor quimiocinas CCR2.

Abstract

Antimicrobial and host defense peptides are a fundamental part of the innate immune system, they are found mainly in tissues exposed to pathogens, they can tear down bacterial membranes and intervene in vital cell functions, these activities were thought to be their main function, even so, there have been findings that these can intervene in immune response, promoting cytokine and chemokine production, thus promoting inflammation and cell movement. This activity could be triggered by the binding of these peptides to receptors present in immune cells.

hBD3M is a recombinant peptide derived from hBD3. In addition to its antibacterial function, hBD3M can also promote monocyte movement through the chemokine receptor CCR2 (a G protein-coupled receptor). To understand hBD3M and CCR2 binding we used homology modelling for both peptide and receptor with software *MODELLER*, the models made were used in peptide-protein molecular docking using the servers *ClusPro* for blind docking and *HADDOCK* for local docking.

With molecular docking, we found that binding occurs in a cavity formed with extracellular regions of the receptor, and that the DYDY region of the receptor contributes free energy favorable for ligand binding. hBD3M cationic nature facilitates binding to CCR2 with a predominantly positive electrostatic surface area. A clear difference with hBD3 is that hBD3M's his-tail could restrain the peptide's binding orientation, having more contact with receptor's N-ter than with other cavity forming regions, it was also found that the forces that guide hBD3M binding to CCR2 are mainly van der Waals interactions, similar to hBD3. With these in silico methods it was possible to obtain a closer look to the binding behavior of peptide hBD3M and chemokine receptor CCR2.

1 Introducción

1.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del sistema inmune. Está mediada por diferentes tipos de células y tejidos. Incluye barreras físicas como piel, epitelio y mucosas, además de células capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y productos de células dañadas o infectadas. Las células de la respuesta inmune innata poseen receptores que reconocen componentes superficiales, proteicos o genómicos de patógenos, entre los que se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs). Estos se pueden encontrar en membranas celulares o en endosomas donde reconocen PAMPs superficiales como lipopolisacáridos y ácidos nucleicos bacterianos, entre otros. Los TLRs desencadenan vías de señalización que promueven la producción de citocinas, la activación celular y el movimiento de células a sitios de infección (quimiotaxis). Otro tipo de receptores son los *NOD-like* que también reconocen DAMPs, PAMPs y reclutan a otras proteínas para inducir inflamación (Abbas, Lichtman, Pillai, 2015; Froy, 2005). El reconocimiento de agentes patógenos, por los diferentes tipos de receptores del sistema inmune innato, activa cascadas de señalización que estimulan la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas. Estas dirigen a células inmunes a los sitios de infección para así activar la respuesta inflamatoria. Durante esta fase ocurren cambios fisiológicos reversibles, como el aumento del flujo sanguíneo y la dilatación de arteriolas (Abbadie, 2005; Abbas et al., 2015).

Otros efectores de la respuesta inmune incluyen a proteínas plasmáticas capaces de neutralizar a patógenos, como las del sistema del complemento, defensinas y catelicidinas. Estas dos últimas son péptidos producidos en células epiteliales y en neutrófilos. Las defensinas y catelicidinas son capaces de penetrar la membrana bacteriana y también se les ha atribuido la regulación de la expresión de citocinas y de la quimiotaxis, por lo que también se les conoce como péptidos de defensa (Abbas et al., 2015).

1.2 Quimiocinas

Las quimiocinas son polipéptidos de 8 a 10 kD, se clasifican en cuatro familias según el número y la posición de cisteínas en el N-terminal, los cuales forman puentes disulfuro que son importantes para la mantener la estructura monomérica de la quimiocina. Su estructura terciaria está compuesta por tres laminas beta sobre una alfa hélice en el C-terminal (Hughes & Nibbs, 2018). Son producidas por leucocitos y células epiteliales tras encontrarse con patógenos. Tras ser secretadas se unen a sus receptores, presentes en la membrana de diversos linajes celulares (Abbas et al., 2015). Las cuatro familias de quimiocinas se clasifican según la presencia de dos residuos de cisteínas, así las CC, en donde se encuentran una directamente después de la otra, las CXC, que tienen un residuo entre ellas, las CX₃C, con tres residuos entre ambas y las XC que carecen de la primera y tercera cisteína del N-terminal. El nombre de una quimiocina se va a presentar primero con la familia seguido de la letra L de ligando y finalmente un número asignado según su descubrimiento (Hughes & Nibbs, 2018).

La unión de las quimiocinas a sus receptores típicamente transduce una señal a través de proteínas-G, promoviendo así la migración celular y la adhesión entre otras respuestas biológicas. La unión de las quimiocinas al receptor se da primero con el N-terminal y las asas extracelulares del receptor. Cabe mencionar que la unión se ve mejorada por la edición postraducciona, ya sea glicosilación, y/o sulfatación de residuos, pues se aumenta la carga negativa del receptor. Esto conlleva también un cambio conformacional por parte del receptor. Generalmente, el nombre del receptor va a ser igual al de la quimiocina ligando, solo cambiando la L por una R en su nombre. En el caso de los receptores de quimiocinas proinflamatorias, la especificidad de unión es compleja, ya que diferentes quimiocinas se pueden unir y activar a un receptor, al igual que se pueden unir a péptidos similares a estas como son las β -defensinas (Hughes & Nibbs, 2018).

1.2.1 *MCP-1 y CCR2*

La proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), también llamada CCL2, es una quimiocina de la familia CC que favorece la quimiotaxis de monocitos y células

T. Es expresada por una gran variedad de células y tejidos, como células epiteliales, músculo liso, fibroblastos, células endoteliales, células mesangiales, astrocitos, células T y células mieloides. Su expresión es provocada por estímulos inflamatorios, como aquellos provocados por las interleucinas 1, 4 y 6, y otras citocinas como $TNF\alpha$, $TGF\beta$, $IFN\gamma$, PDGF, VEGF, M-CSF y GM-CSF (Gschwandtner, Derler, & Midwood, 2019).

CCR2 es el receptor natural de MCP-1, y es miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G, los cuales se caracterizan por tener cuatro regiones extracelulares, siete intramembranales y cinco intracelulares. Existen dos variantes del receptor, CCR2a y CCR2B, producidas por *splicing* alternativo y que difieren en su C-terminal. Su expresión varía en diferentes tipos celulares: CCR2A es expresada mayormente en células mononucleares y músculo liso, mientras que CCR2B es sintetizada principalmente por monocitos y células NK activadas. Ambas isoformas presentan afinidad similar a MCP-1 (Kothandan et al., 2012). Entender cómo se da la unión de CCL2 a CCR2 nos puede dar una idea clara de la unión del receptor a otros ligandos, como defensinas y péptidos antimicrobianos, con lo que se podrá entender un poco de las interacciones de estas moléculas con elementos del sistema inmune.

1.3 Péptidos antimicrobianos y péptidos de defensa del hospedero.

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés) son péptidos efectores de la respuesta inmune innata a patógenos. Se encuentran en la gran mayoría de organismos y sirven para evitar y contrarrestar la colonización por diferentes microorganismos (Boman, 1995). Su mecanismo de acción se basa en la formación de poros en la membrana plasmática, aunque también pueden intervenir en funciones celulares bacterianas importantes. De igual forma, se ha reportado que pueden interactuar con células del sistema inmune y así influir en este (Lai & Gallo, 2009). Su función principal es reconocer a patógenos a través de características compartidas por estos microorganismos. Presentan estructuras y características diversas, por lo que se pueden dividir en una gran variedad de grupos: aniónicos, catiónicos lineales con alfas hélices, catiónicos enriquecidos en aminoácidos

específicos, aniónicos y catiónicos con puentes disulfuro o fragmentos de proteínas más grandes. Además, pueden adquirir estructuras tridimensionales de asa, laminas beta, con puentes disulfuro, o alfa hélice, Figura 1 (Brogden, 2005).

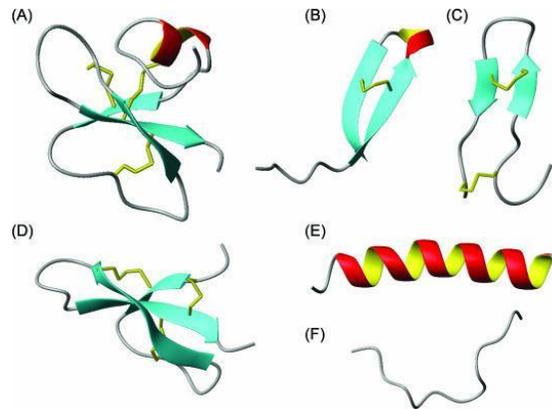


Figura 1. Diversidad estructural de los péptidos antimicrobianos. Los péptidos pequeños suelen tener forma de asa, mientras que los de mayor tamaño pueden presentar estructura secundaria de láminas beta o alfa-hélices. (A) Estructura de la hBD2; (B) Thanatina (AMP de insecto); (C) Polyfemusina (AMP de cangrejo herradura); (D) Defensina-1 de riñón de conejo; (E) magainina ii proveniente de *Xenopus laevis* y (F) indolicidina proveniente de neutrófilos bovinos (Imagen obtenida de Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006).

Generalmente se acepta que la interacción entre los AMPs con las membranas se da porque poseen cargas positivas que son atraídas a las cargas negativas de las membranas bacterianas, mientras que la anfipaticidad es necesaria para la disrupción de la membrana, ya que permite la introducción del péptido a ésta, Figura 2 (Takahashi *et al.*, 2010).

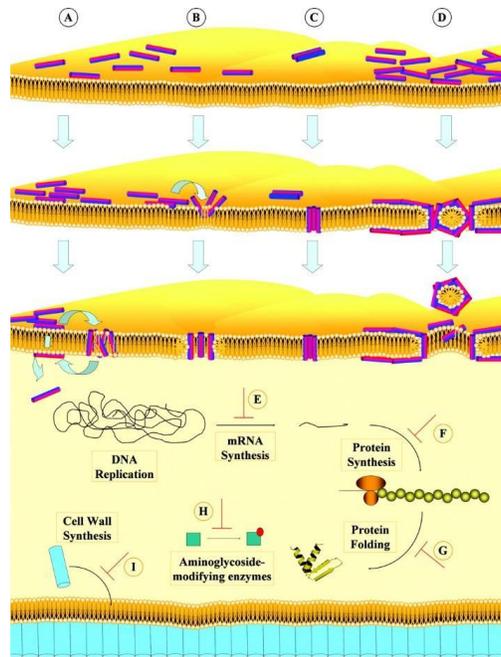


Figura 2. Formación de poros y blancos intracelulares (Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006).

Originalmente se pensó que la formación de poros en membranas bacterianas era la única actividad asociada a estos, pero se ha observado que algunos péptidos, a pesar de tener buena actividad *in vitro*, ven disminuido su efecto en condiciones fisiológicas por la concentración de sales, glucosaminoglicanos y suero. Pese a esto, en estudios recientes se ha indicado que estos péptidos son capaces de modular la respuesta inmune del hospedero (Afacan, Yeung, Pena, & Hancock, 2012; Hancock, Nijnik, & Philpott, 2012; Nijnik & Hancock, 2009). Las propiedades inmunomoduladoras de los péptidos de defensa de huésped (HDPs, por sus siglas en inglés) incluyen la reducción de la expresión de citocinas proinflamatorias, modulación de la expresión de quimiocinas, estimulación de la angiogénesis, activación de leucocitos y diferenciación de macrófagos y leucocitos (Lai & Gallo, 2009). También se ha asociado la desregulación de HDPs a condiciones patológicas y su ausencia a infecciones persistentes (Lande *et al.*, 2007). Los HDPs y los reguladores de la defensa innata (IDRs, por sus siglas en inglés) muestran propiedades anti infeccivas, incluso cuando son sintéticos, lo cual se ha atribuido a su capacidad de manipular las funciones de células inmunes, aparte de su actividad directa antimicrobiana (Afacan *et al.*, 2012; Nijnik & Hancock, 2009).

1.4 Mecanismos de acción de los HDPs

El mecanismo de acción de los HPDs varía de célula a célula, pero en general interactúan con receptores de superficie o con la membrana plasmática para después ser traslocados al interior de la célula en donde se unirán a receptores intracelulares (Scott *et al.*, 2007). La unión a receptores estimula vías de transducción importantes para la inmunidad, lo cual conlleva a la movilización de factores de transcripción al núcleo para activarlos o inactivarlos (Mookherjee *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2007). Una de las consecuencias de la unión de HDPs/IDRs a receptores es la diferenciación y activación celular, la cual se ha observado en monocitos, macrófagos, células dendríticas y en neutrófilos (Niyonsaba *et al.*, 2013). La mayoría de HDPs e IDRs suprimen citocinas proinflamatorias en modelos infecciosos en ratón, pero también se conocen efectos proinflamatorios (Scott *et al.*, 2007). Por parte de su actividad anti infectiva se ha observado que la administración del péptido HNP-1 a ratones, les protege contra infecciones por *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (Welling *et al.*, 1998). De igual forma, el péptido denominado IDR-1, derivado de la bactericina bovina, promueve la producción de quimiocinas involucradas en contrarrestar infecciones y suprime la producción de citocinas proinflamatorias, protegiendo así a ratones de infecciones por bacterias Gram positivas y negativas (Scott *et al.*, 2007). Por otro lado, estudios con el péptido sintético IDR-1002 han mostrado que interactúa con receptores acoplados a proteína G y modula las vías PI3K, NF- κ B y MAPK. Estos efectos promueven la migración de monocitos y la unión a fibronectina (Madera & Hancock, 2012). También se ha encontrado que la beta defensina humana-2 comparte el receptor CCR6 con la quimiocina CCL-20 e induce, aunque de manera menos eficiente, la quimiotaxis de células T (Yang *et al.*, 1999).

Como reguladores de la respuesta inflamatoria se sabe que la catelicidina LL-37 suprime la respuesta proinflamatoria provocada por el LPS, así como también impide la traslocación de las subunidades p50 y p65 de NF- κ B, con lo que modula la transcripción de citocinas inflamatorias y aumenta la de las antiinflamatorias (Mookherjee *et al.*, 2006). De igual forma, puede modular selectivamente la repuesta

inflamatoria en macrófagos, células epiteliales de pulmón, células mononucleares y leucocitos interactuando con receptores tipo Toll (TLRs) (Mookherjee et al., 2006; Walters, Dubey, Jeffrey, & Dixon, 2010).

1.5 Defensinas

Las defensinas son un grupo de HDPs relacionadas evolutivamente entre ellas y con estructuras particulares. Presentan tres puentes disulfuro formados por seis cisteínas y una secuencia rica en aminoácidos con carga positiva (Selsted, Harwig, Ganz, Schilling, & Lehrer, 1985). Las dos familias principales son: alfa- y beta-defensinas, las cuales difieren entre sí por la distancia entre las seis cisteínas y el apareamiento que tienen entre ellas para formar puentes disulfuro (Figura 3) (Ganz & Lehrer, 1994). Por otro lado, existen también las teta defensinas, que se han encontrado en primates como el mono *Rhesus*. Estos son péptidos cíclicos formados a partir de un precursor parecido al de la alfa-defensina. Estructuralmente, las alfa- y beta-defensinas poseen tres laminas beta y una alfa hélice, mientras que las teta-defensinas presentan solo lamina beta (Ganz, 2003).

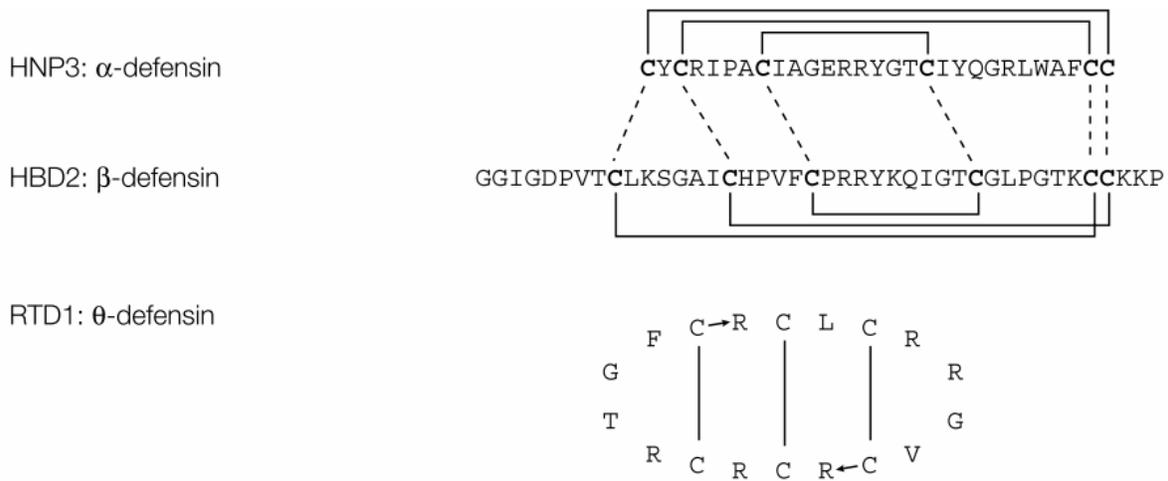


Figura 3. Secuencia y enlaces de sulfuro de las defensinas alfa, beta y teta (Ganz, 2003).

Tanto las alfa- como las beta-defensinas se encuentran en todos los mamíferos, son abundantes en células y tejidos involucrados en defensa contra infecciones microbianas (Ganz, 2003; J. Harder, Bartels, Christophers, & Schröder, 1997).

En general, las defensinas muestran actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos en condiciones de baja fuerza iónica, concentraciones bajas de cationes divalentes y de proteínas plasmáticas. Afectan a bacterias metabólicamente activas, ya que bacterias inactivas, por privación de nutrientes o inhibidores metabólicos, pueden evadir su actividad (Lehrer, Ganz, Szklarek, & Selsted, 1988; Selsted, Szklarek, Ganz, & Lehrer, 1985). Entre las defensinas más potentes en actividad antimicrobiana está la beta defensina humana 3 (hBD3), la cual es un péptido de 45 aminoácidos cuya expresión es inducida por procesos inflamatorios en queratinocitos y amígdalas. Se expresa en bajas concentraciones en el epitelio de los sistemas respiratorio, genitourinario y digestivo. Es bactericida contra bacterias Gram-positivas, como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium* (García et al., 2001; Jürgen Harder, Bartels, Christophers, & Schröder, 2001). Se ha observado que hBD3 interactúa con receptores de detección de patógenos, como los TLRs y receptores de quimiocinas, ya sea para inhibir la quimiotaxis o promoverla, así como de inducir la expresión de coestimuladores en células presentadoras de antígeno (Feng et al., 2006; Funderburg et al., 2007; Rohrl, Yang, Oppenheim, & Hehlhans, 2010), ya que al interactuar con TLR-1 y -2 induce la maduración de células dendríticas y monocitos (Feng et al., 2006). También se ha reportado que hBD3 antagoniza la activación de CXCR4 (Jürgen Harder et al., 2001). Por otro lado, esta defensina tiene un efecto quimioatractivo de células HEK-193 mediante su interacción con CCR2 y en monocitos de sangre periférica (Röhrl, Yang, Oppenheim, & Hehlhans, 2010).

Parte importante de la función de hBD3 se debe a su secuencia y estructura, ya que se ha demostrado que la capacidad de hBD3 para disminuir la expresión de IL-1 β y TNF se debe a los últimos 15 aminoácidos de su región C-terminal, además de que este fragmento disminuye la infiltración de neutrófilos inducida por LPS (Feng, Dubyak, Jia, Lubkowski, & Weinberg, 2013; J. Y. Lee *et al.*, 2015). Esto, sumado a la importancia de las argininas, R42 y R43, para su actividad formadora de poros y para la inducción de IL-6, demuestra la relevancia que tiene su estructura con relación a su función (Sakagami-Yasui *et al.*, 2017). Cabe mencionar que estas

funciones no son exclusivas de hBD3, ya que hBD2, y 6 también son capaces de servir de ligando para CCR2 e inducir la quimiotaxis de monocitos (Röhrl et al., 2010).

1.6 Papel de la estructura tridimensional en el efecto inmunomodulador

Generalmente estos péptidos tienen estructura desordenada en medio acuoso y adoptan una estructura tridimensional al interactuar con una membrana lipídica (Sitaram & Nagaraj, 2002). Los péptidos con estructura predominante de alfa hélice componen de entre un tercio a la mitad de los que se han identificado; tienen de 12 a 40 aminoácidos y es común encontrarlos desordenados en los extremos N- y C-terminal. Algunos poseen una prolina en su secuencia, la que puede generar una bisagra entre la hélice (Takahashi, Shukla, Prakash, & Zhang, 2010). Existen también péptidos que poseen de 2 a 10 residuos de cisteína y forman de 1 a 5 puentes disulfuro son los que adoptan una estructura de lámina beta. Los HDPs que tienen 2 o 4 cisteínas adoptan, frecuentemente, estructuras de una horquilla beta (Tossi & Sandri, 2002). Para ejercer su función moduladora, los HDPs pueden interactuar con diversos receptores; sin embargo, no se tiene un entendimiento claro de qué características son necesarias para que esto ocurra (Takahashi *et al.*, 2010).

1.7 Modelado de péptidos

Como ya se ha mencionado, el efecto que puede tener un péptido depende de la estructura que presente, por lo que el obtener y estudiar modelos estructurales de péptidos nos permite predecir su actividad y dinámica. El diseño de estos modelos parte de que la conformación esquelética de cada aminoácido está dada por sus ángulos diedros *psi* y *phi* (MacKerell *et al.*, 1998). El modelado de péptidos se puede llevar a cabo por métodos *de novo* o de modelado por homología dependiendo del tamaño del péptido, de su estructura y de que existan modelos previos de péptidos o proteínas homólogos a este.

1.7.1 *Modelado de novo*

El modelado de péptidos se puede realizar por diferentes métodos, ya sea: dinámica molecular, simulaciones de energía libre, *Replica Exchange*, muestreo acelerado,

caminos de transición y cinética de redes. El modelado por dinámica molecular está basado en ecuaciones Newtonianas de movimiento de todos los átomos en un sistema. Las interacciones entre átomos se describen por funciones de potenciales empíricos o campos de fuerza derivados de experimentos y de cálculos mecánico cuánticos en fase gaseosa (Kuczera, 2015; Thévenet, Rey, Moroy, & Tuffery, 2015). Las simulaciones de dinámica molecular son un método sencillo y eficaz para determinar la energía de un sistema. Los demás métodos generalmente consideran restricciones predichas desde la secuencia de aminoácidos para generar las posibles conformaciones. En las simulaciones de energía libre se calculan los cambios de energía en diferentes procesos, como cambios conformacionales, plegamiento, unión o mutaciones, además de que tienen la ventaja de que pueden describir procesos lentos con un bajo error (Mobley & Klimovich, 2012). Entre los sistemas que permiten realizar este tipo de análisis, se encuentra PEP-FOLD, que es un servidor que utiliza *Hidden Markov Models* (HMM, excluyen información previa) para formar un alfabeto estructural en el que cada “letra” está conformada por cuatro aminoácidos y cada letra está asociada a descriptores geométricos, con lo que las estructuras finales se forman acoplando estas letras una tras otra (Camproux, Gautier, & Tufféry, 2004).

1.7.2 Modelado por homología

La base del modelado por homología es que la estructura tridimensional de una proteína está dada principalmente por su secuencia de aminoácidos y que la estructura de las proteínas es más conservada que su secuencia, la cual puede cambiar y, al mismo tiempo, conservar sus propiedades por sustituciones conservativas. Esto se debe a que proteínas con un origen evolutivo común suelen conservar regiones importantes, aunque presenten cambios en su secuencia. Los aminoácidos que componen estas regiones suelen conservar propiedades fisicoquímicas parecidas, por lo que si dos secuencias son homólogas suelen tener plegamientos y funciones similares (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019). Para este tipo de modelado se debe de buscar una o más plantillas que sirvan como base para la formación de los nuevos modelos. Esto se hace al introducir la secuencia de

aminoácidos de interés en una base de datos de proteínas o péptidos con estructura dilucidada por difracción de rayos-X, resonancia magnética nuclear, o criomicroscopía electrónica. Las secuencias deben de tener una identidad mayor al 30% para generar modelos que puedan ser confiables (Peng, 2013). Las secuencias “plantilla” y “problema” se deben de alinear de forma cuidadosa para evitar errores en la formación de los modelos, ya que estos son generados de acuerdo con las coordenadas de átomos de las estructuras y el alineamiento de secuencias. Ciertos programas emplean restricciones espaciales como: tamaño, longitud de enlaces, ángulos diédricos y distancia de contacto de interacciones de van der Waals impuestas por las plantillas y de acuerdo con patrones espaciales observados experimentalmente (Webb & Sali, 2016).

Un paso importante es el modelado de asas, ya que suelen tener gran relevancia funcional, pero su estructura no es conservada. La predicción estructural de asas se puede hacer con estructuras conocidas que sirven como núcleo para su formación o buscando las conformaciones de menor energía mediante la optimización de los modelos. Esto parte de una minimización de energía en la que se usan campos de fuerza de mecánica molecular para eliminar errores asociados a la disposición de los carbonos alfa o las cadenas laterales de los aminoácidos (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019), puesto que establecer restricciones en la posición de átomos para cada aminoácido y realizar una minimización de energía de algunos cientos de pasos al modelo mediante el uso de campos de fuerza puede disminuir problemas de estereoquímica en la formación de modelos tridimensionales.

Un parámetro importante para la validación de los modelos generados por homología es el cálculo del RMSD (*Root-Mean-Squared Deviation*), el cual permite conocer la distancia, en Ångström, entre los átomos que se usaron para modelar la secuencia y el modelo generado. Con esto se puede determinar la divergencia estructural entre estas dos y con ello errores estereoquímicos similares a este. Es así como valores pequeños de RMSD indican un modelo casi idéntico a la plantilla. La presencia de choques estéricos y que el modelo sea energéticamente favorable se puede estudiar con gráficas de Ramachandran, que indican si la disposición de

los ángulos diedros de los aminoácidos es energéticamente favorable, con base en la distribución espacial de los ángulos de torsión *phi* y *psi* de cada aminoácido previamente reportado en otros modelos tridimensionales (Nelson & Cox, 2013).

1.8 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una herramienta útil y económica para evaluar interacciones entre una proteína y una molécula pequeña. Los péptidos son más flexibles y pueden adoptar varias conformaciones, por ende, el acoplamiento proteína-péptido es más desafiante y consume más tiempo que el acoplamiento con moléculas pequeñas (London, Raveh, & Schueler-Furman, 2011). En el caso de interacciones proteína-péptido la metodología para esta técnica se puede dividir en tres categorías: acoplamiento a base de templado, acoplamiento local y acoplamiento global (Ciemny *et al.*, 2018). El acoplamiento a base de templado parte del uso de estructuras denominadas *templado* como andamios para construir un modelo del complejo. Este método es particularmente efectivo si el templado es similar en estructura y en la manera en la que se unen las proteínas o péptidos implicados al complejo que se desea investigar. Por otro lado, el acoplamiento local busca la pose de unión del péptido en la proximidad de un sitio de unión propuesto; de esta manera la exactitud depende de las restricciones que se requieran. Finalmente, el acoplamiento global (*blind docking*) realiza una búsqueda de posibles sitios de unión en torno a la proteína completa. Esto puede ser útil para corroborar que el acoplamiento es correcto si se encuentran los sitios de unión nativos de la proteína, lo cual es útil como evaluación de los métodos de acoplamiento molecular (Agrawal *et al.*, 2019; Porter *et al.*, 2017).

Existen diferentes métodos computacionales para hacer acoplamiento molecular proteína-proteína o proteína-péptido que suelen ser diferentes a aquellos destinados para proteína-moléculas pequeñas. Cabe mencionar que se deben de conocer de antemano los posibles sitios de interacción para no crear falsos positivos y obtener interacciones confiables que puedan representar la realidad. La robustez de los programas se puede corroborar con el acoplamiento ciego; con esto, si las interacciones de los acoplamientos local y ciego llegan a coincidir se puede hablar

entonces de complejos más confiables (Ciemny et al., 2018). En el caso de los AMPs, el acoplamiento molecular ha servido para determinar cómo interaccionan con lipoproteínas bacterianas y con lipopolisacáridos, mientras que para los HDPs se ha empleado para estudiar su unión con receptores de células de eucariontes (Le et al., 2015; L.-F. Lee, Mariappan, Vellasamy, Lee, & Vadivelu, 2016). En un ensayo con péptidos sintéticos se observó sinergia con tratamientos contra *Streptococcus pneumoniae* y para observar el efecto del péptido DM3 se realizó acoplamiento molecular con *AutoDock Vina*, en el que se observó que dicho péptido interactúa con la autolisina en la superficie de la bacteria (Le et al., 2015). En otro caso, el péptido TP1, proveniente del cangrejo herradura, fue modelado *in silico* con la herramienta ADV y se determinaron las interacciones que mantiene con la autolisina, la pneumolisina, la proteína Psp A y el LPS de *Burkholderia pseudomallei* (L.-F. Lee et al., 2016). El grupo de Yan et al., (2016) encontró un péptido, WH, capaz de unirse a Clec9, una lectina que promueve la presentación cruzada de antígenos en células T citotóxicas en respuesta antitumoral tras dilucidar la estructura tridimensional con PEP-FOLD y las interacciones que podrían presentar WH y Clec9 mediante el uso de Z-Dock, las cuales fueron confirmadas posteriormente por mutagénesis. En este estudio el acoplamiento molecular sirvió de guía para proponer los sitios de unión y los aminoácidos importantes en dicha interacción.

Con lo antes mencionado, se puede concluir que las interacciones determinadas por acoplamiento molecular pueden ser acertadas, aunque la única manera de saber la eficacia de los complejos generados y determinar los sitios de unión es mediante experimentos *in vitro* o *in vivo*, con mutagénesis. Sin embargo, esto no resta importancia al uso de dichos modelos, pues en repetidas ocasiones se ha corroborado cómo el correcto planteamiento y análisis de estos experimentos *in silico* logran servir de guía inicial al estudio de dichas interacciones.

2 Antecedentes

2.1 Beta defensina humana 3

En estudios para crear una forma más eficiente de producir defensinas de forma recombinante se creó el vector para expresar la hBD3, el cual se expresó en cepas de *E. coli*, y la proteína obtenida se denominó HBD3M (Corrales-Garcia et al., 2013). Se probó su actividad antimicrobiana e inmunomoduladora y se observó una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 5 μM para *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, además de una IC_{50} (concentración en la que se inhibe el 50% de la población bacteriana) de 0.4, 0.5 y 0.7 μM para *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* respectivamente, con lo que se le puede considerar un buen agente antimicrobiano en comparación con los antibióticos convencionales. Para diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis* se obtuvo una MIC de 13.5 μM para la cepa multidrogo resistente. Con un ensayo de bioluminiscencia se determinó que posee efecto quimioatrayente a 250 nM en células de monocitos de humano, THP-1. Cabe mencionar que el péptido no presenta toxicidad en ensayos de hemólisis. Se determinó también el efecto antimicrobiano en modelos de infección con *S. aureus* de herida *in vivo* en piel de conejo y se observó que, si bien se necesitaban altas concentraciones de la defensina para erradicar la infección, la cicatrización se ve promovida con HBD3M a 17.9 μM (Corrales et al., 2013; Ibarra, 2017; Rivas, 2018).

2.2 Unión de ligandos a CCR2

Se ha encontrado que la región N-terminal de CCR2 es importante en la unión a sus ligandos, MCP-1 y hBD6, y que son de particular importancia los residuos: D25, Y26, D27 y Y28 (localizados en el N-terminal extracelular) Figura 4, Tabla 1 (Feria & Díaz-González, 2006; Shi et al., 2002; De Paula et al., 2013; Deshmane et al., 2009; Hemmerich et al., 1999). También se sabe que las regiones extracelulares: EC1, EC2 y EC3 tienen afinidad por MCP-1 y que son importantes para la cascada de señalización que se desencadena al unirse el ligando (Monteclaro & Charo, 1996). El N-terminal, que también participa en la activación de la cascada de señalización, tiene afinidad a MCP-1 por sí solo e incrementa la afinidad de las regiones extracelulares al ligando (Monteclaro & Charo, 1997).

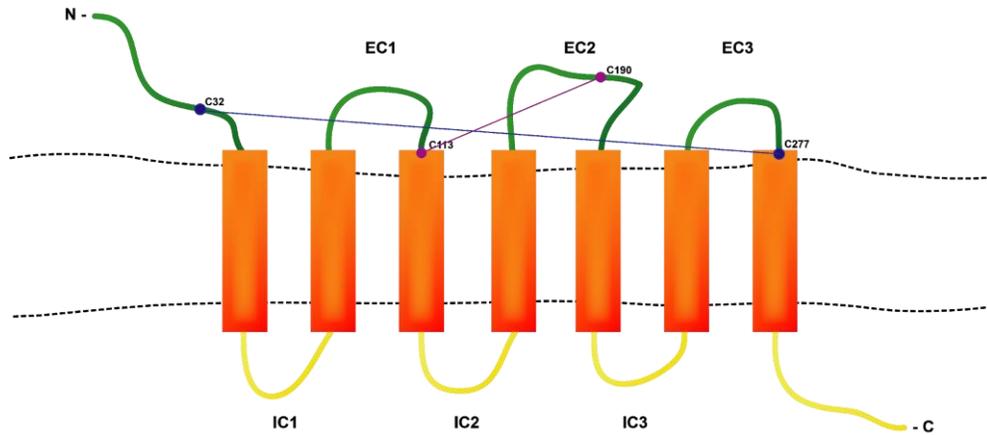


Figura 4. Diagrama representativo de CCR2. CCR2 es un receptor acoplado a proteína G, cuenta con cuatro regiones extracelulares (N-terminal, EC1, EC2 y EC3), siete regiones transmembranales y cuatro intracelulares (C-terminal, IC1, IC2 e IC3), posee dos puentes disulfuro en la región extracelular, C32 – 277 y C113 – C190. En la imagen se muestran aspas de color verde para la región extracelular y amarillo para la intracelular, alfas hélices de color naranja-rojo. Puentes disulfuro marcados con punto y línea recta.

Tabla 1. Topología de CCR2.

Región	Residuos	Región	Residuos	Región	Residuos
N-terminal	1 - 42	TM3	115 - 136	IC3	227 - 243
TM1	43 - 70	IC2	137 - 153	TM6	244 - 268
IC1	71 - 80	TM4	154 - 178	EC3	269 - 285
TM2	81 - 100	EC2	179 - 206	TM7	286 - 309
EC1	101 - 114	TM5	207 - 226	C-terminal	310 - 374

Se ha observado que hBD3 interactúa con diferentes receptores de quimiocinas, como CXCR4 y CCR2 (Deshmane et al., 2009; Feng et al., 2013), y se ha determinado que los residuos R42 y R43 de la hBD3 son importantes para la actividad antimicrobiana y para la producción de IL-6, una citocina proinflamatoria cuya expresión es promovida también por CCR2. Se ha identificado también el motivo DYDY (residuos 25, 26, 27 y 28), que es importante en la interacción entre CCR2 con MCP-1 y la hBD6 y se sabe que la sulfatación de las tirosinas 26 y 28 aumenta la afinidad a dicho péptido (De Paula et al., 2013; Hemmerich et al., 1999). Es así como el entendimiento de la estructura tanto del ligando como del receptor es de importancia para entender cómo se rige la unión de estos, las características que permiten la unión e incluso, con más estudios de función del receptor ante los diferentes ligandos, si la unión provoca una reacción diferente dependiendo del ligando.

3 Hipótesis

La unión de hBD3 y hBD3M a CCR2 es guiada por interacciones electrostáticas similares a las que tiene con CCL2 y hBD6.

4 Justificación

Se ha demostrado mediante modelados *in silico* la existencia de interacciones entre hBD3 y receptores de citocinas y quimiocinas y se ha corroborado con métodos *in vitro*. Es así como el uso de herramientas computacionales permite predecir los mecanismos de interacción ligando-receptor y puede ser un primer paso en la determinación de estas interacciones, por lo que resulta de interés el comprender cómo la hBD3M hacer un escaneo inicial que servirá como propuesta para un futuro estudio de dicha interacción a nivel *in vitro*.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

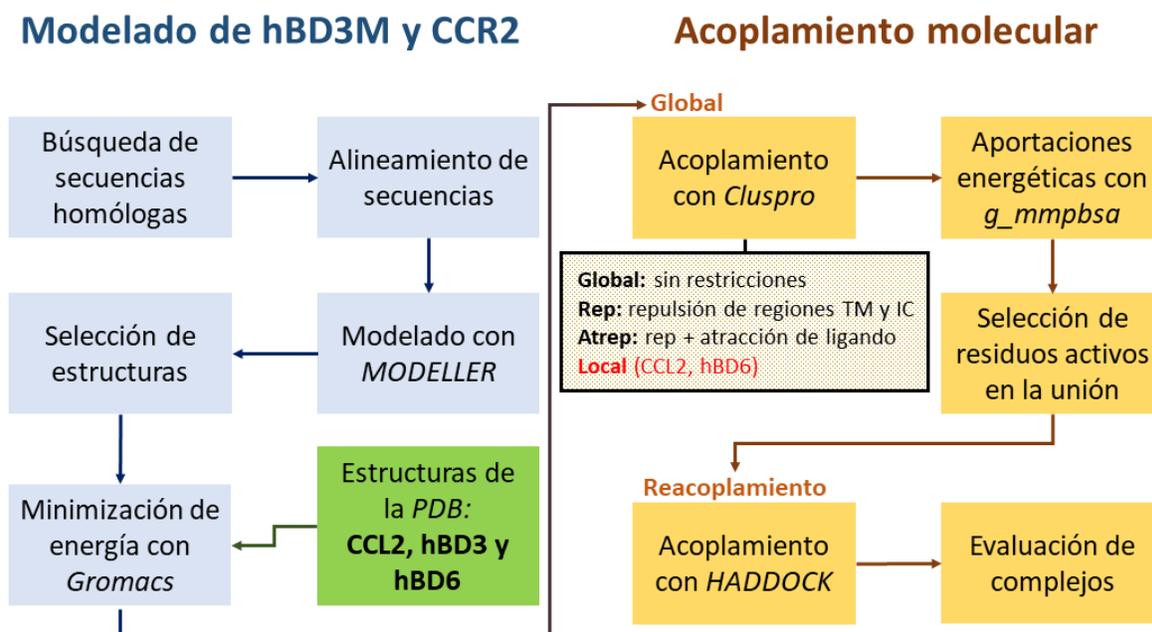
Obtener representaciones tridimensionales de la estructura del péptido hBD3M, y proponer un modelo de interacción entre el receptor CCR2 y los péptidos hBD3 y hBD3M.

5.2 Objetivos particulares

- Generar modelos de la estructura tridimensional de hBD3M y CCR2.
- Proponer el tipo de interacciones entre el ligando y el receptor.
- Evaluar y comparar los complejos generados con los reportados previamente.

6 Material y métodos

6.1 Esquema de trabajo



6.2 Herramientas

6.2.1 *BLAST*

Basic local alignment search tool es una herramienta de búsqueda de secuencias homólogas dada una secuencia problema que encuentra alineamientos entre dos secuencias para después alinearlos y brindar información estadística sobre la significancia del alineamiento (McGinnis & Madden, 2004). Califica dichos alineamientos de acuerdo con el grado de similitud entre las secuencias y asigna calificaciones positivas a los aminoácidos iguales o con propiedades similares y negativas cuando los aminoácidos no comparten propiedades. Para esto, usa matrices de sustitución, siendo PAM-120 la empleada para secuencias proteicas ya que es la que se considera como la más útil para el estudio de proteínas (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990).

6.2.2 *T-COFFEE*

Tree-based Consistency Objective Function for Alignment Evaluation, es una herramienta para el alineamiento múltiple de secuencias. En este caso fue empleado para reevaluar los alineamientos por *BLAST* y para la evaluación de la homología entre hBD6 y hBD3. *T-COFFEE* crea librerías de pares de alineamientos para guiar el alineamiento múltiple (Notredame, Higgins, & Heringa, 2000).

6.2.3 *MODELLER*

MODELLER es una herramienta de modelado comparativo de proteínas. Este programa predice el modelo de acuerdo con un molde, una estructura proteica o peptídica, determinada por medios experimentales, y tomando en cuenta restricciones conformacionales de los aminoácidos, también obtenidas de forma experimental (Webb & Sali, 2016). *MODELLER* utiliza la energía DOPE (*Discrete optimized protein energy*) como evaluador de los modelos. Dicho cálculo de energía sirve como un potencial estadístico basado en distancias atómicas de átomos provenientes de estructuras nativas depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB). También se emplea el valor *molpdf* (función objetiva de *MODELLER*), que sirve de guía para la selección de los modelos, ya que calcula las posiciones de los átomos y las violaciones de ciertas restricciones posicionales obtenidas de un consenso de

la disposición de los residuos de diferentes modelos de la PDB. Es así como la energía DOPE es un estimado de la energía libre del modelo y la calificación *molpdf* un estimado de las restricciones violadas en el modelo (Shen & Sali, 2006).

Otra herramienta empleada fue el *Loop refinement* de *MODELLER*, que predice la posición de átomos no hidrogenados de un asa determinada con una función de energía optimizada y toma en cuenta restricciones asociadas a asas obtenidas experimentalmente (Fiser, Do, & Šali, 2000).

6.2.4 PROCHECK

Es un programa para la verificación de la estereoquímica de modelos estructurales de proteínas y péptidos. Determina si los ángulos *psi* y *phi* de los aminoácidos son aceptables de acuerdo con parámetros y de distancia y ángulos de enlaces establecidos en diversos análisis *in vitro*. *PROCHECK* está compuesto por cinco programas: *CLEAN.F*, que convierte los átomos a la nomenclatura IUPAC; *SECSTR.F*, que crea asignaciones de estructura secundaria residuo por residuo; *NB.C*, que identifica las interacciones no ligadas; *ANGLEN.F*, que calcula las distancias y ángulos de los enlaces de la cadena principal, y *PLOT.F*, el cual crea gráficas de Ramachandran y una lista con la información sobre los ángulos de cada residuo (Laskowski, MacArthur, Moss, Thornton, & IUCr, 1993).

6.2.5 ERRAT

Es una herramienta que hace un análisis de los choques estéricos que puede presentar el modelo de una proteína. Resalta posibles regiones que presenten choques estéricos y con base en esto asigna una calificación al modelo, la cual indica el porcentaje de uniones correctas (Colovos & Yeates, 1993).

6.2.6 ProFit

Realiza un alineamiento de dos estructuras. En este caso es usado para la comparación de los modelos generados por homología con las estructuras moldes (Martin & Porter, 2010; McLachlan, 1982).

6.2.7 GROMACS y Charmm36m

GROMACS junto con el campo de fuerza *Charmm36M* se emplearon en la minimización energética de los modelos obtenidos por homología y preparar los complejos generados en el acoplamiento molecular para el análisis con *g_mmpbsa*.

GROMACS es un programa con que se pueden realizar simulaciones del movimiento de un sistema, diseñado para proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. GROMACS provee una serie de herramientas para la realización de simulaciones, así como para el análisis de éstas (Abraham et al., 2015). *Charmm36M* es un campo de fuerza diseñado para realizar simulaciones, en este caso empleado junto con GROMACS. *Charmm36m* es una actualización del campo de fuerza *charmm36*, con esta nueva versión optimizada para proteínas y para la simulación de proteínas, o péptidos, intrínsecamente desordenados (Huang et al., 2016; Vanommeslaeghe et al., 2009)

6.2.8 ClusPro

ClusPro es un servidor que emplea el programa *PIPER* *falta la referencia*. En éste se tiene que definir el receptor y el ligando, se fija el centro de masa del receptor en el origen del sistema y se evalúan las posibles posiciones rotacionales y traslacionales del ligando. Califica los complejos con la fórmula $E = w_1E_{rep} + w_2E_{attr} + w_3E_{elec} + w_4E_{DARS}$, donde w_1E_{rep} y w_2E_{attr} son las contribuciones de energía de atracción y repulsión de la fuerza de van der Waals, w_3E_{elec} es un término de energía electrostática, w_4E_{DARS} representa energía libre debido a desolvatación al retirar agua del sistema y los coeficientes w_1 , w_2 , w_3 y w_4 son los pesos de cada término. Este programa clasifica los complejos generados con 4 funciones, balanceada, favorable hidrofóbica, favorable electrostática y van der Waals-electrostática, y recomienda utilizar la función balanceada si se desconocen las interacciones de las moléculas a acoplar.

6.2.9 Prodigy

Es un servidor que encuentra la interfaz de unión entre dos proteínas y con base en esta interfaz y en el área no unida de las proteínas calcula la fuerza de unión

tomando en cuenta datos experimentales de afinidad de complejos reportados en bases de datos de estructuras proteicas (Xue, Rodrigues, Kastritis, Bonvin, & Vangone, 2016).

6.2.10 *g_mmpbsa*

Molecular mechanics Poisson-Boltzmann Surface area. Es una herramienta que se puede utilizar con *GROMACS*; determina la energía de unión de complejos de proteínas al calcular la energía libre del receptor, el ligando y el complejo. Esta energía está dada por tres términos de energía: el primer término esta dado por los cambios de energía en el vacío, lo que incluye a términos de enlaces (energías de unión, ángulo y torsión) y términos no enlazados (interacciones de van der Waals y electrostáticas); el segundo término esta dado por la desolvatación de diferentes especies, siendo la suma de dos términos energéticos como las energías de solvatación polar y no polar; finalmente, el tercer término es la entropía configuracional asociada a la formación del complejo en fase gaseosa (Kumari, Kumar, & Lynn, 2014).

6.2.11 *HADDOCK*

High ambiguity driven protein-protein docking es una herramienta para obtener información bioquímica y/o biofísica de interacciones, toma en cuenta a los residuos interactuantes como restricciones ambiguas de interacción obtenidas de información experimental. Después de calcular los modelos los califica de acuerdo con su energía intramolecular (AIR, por sus siglas en inglés), siendo estos términos energéticos de electrostática, van der Waals y AIR. El programa hace el acoplamiento en tres pasos: En el primero las moléculas giran aleatoriamente desde su centro de masa, se hace una minimización de energía que permite que las moléculas giren para reducir la energía del sistema, después se permite la traslación y rotación de las moléculas y son acopladas, esto hasta que se forman 1,000 complejos, aproximadamente. En el segundo paso, se seleccionan 200 de los 1,000 complejos y se refina su orientación, cadena lateral de la interfaz (sitios de unión) y las cadenas principal y lateral de la interfaz. Los complejos restantes son pasados por una minimización en picada (*steepest descent*) de 200 pasos. El último

paso es un refinamiento con moléculas de agua TIP3P (Dominguez, Boelens, & Bonvin, 2003).

6.2.12 *CoCoMaps*

Una herramienta en línea para obtener mapas de contactos en complejos proteicos, utiliza un umbral de 8 Å para identificar los residuos que interactúan en la interfaz de unión y otro de 16, 13, 10 y 7 Å para identificar los residuos cercanos entre sí. También reconoce las interacciones como hidrofílica-hidrofílica, hidrofílica-hidrofóbica e hidrofóbica-hidrofóbica, al igual que los puentes hidrógeno (Vangone, Spinelli, Scarano, Cavallo, & Oliva, 2011).

6.2.13 *FiberDock*

FiberDock es un servidor para hacer predicciones de poses en interacciones proteína-proteína, y las refina para poder obtener fuerzas de unión más acertadas. Las proteínas son flexibles, ya que poseen cierto grado de libertad de movimiento, por lo que generalmente las proteínas cambian de conformación al unirse a un ligando, por eso al hacer solo acoplamiento rígido se puede perder efectividad en la predicción de poses (E. Mashiach, Nussinov, & Wolfson, 2010). En este caso se empleó para refinar los modelos creados con *ClusPro*. Este servidor emplea un análisis de modo normal (*NMA, normal mode analysis*), con el que se describe la flexibilidad de las proteínas como una combinación de movimientos lineales discretos, este análisis describe el movimiento de la proteína de acuerdo con vectores conformados por tres carbonos alfa. Los autores del programa simplifican estos vectores como *normal modes (NM)*, los cuales se distribuyen por el espacio conformacional de la proteína, el coeficiente de estos representa su amplitud, además de esto el análisis también provee la frecuencia de vibración de cada modelo (Efrat Mashiach, Nussinov, & Wolfson, 2010).

La opción de refinamiento con *FiberDock* primero modela la flexibilidad de la cadena lateral al optimizarla de acuerdo con una librería de rotámeros, después hace un refinamiento de la cadena principal de hasta 20 iteraciones, donde se aplican las fuerzas repulsivas de van der Waals de los mejores *NM*, el uso de las fuerzas repulsivas de van der Waals ayuda a escoger *NM* que describen el movimiento de

la cadena lateral que mejor resuelven los choques estéricos. Posteriormente, se hace una minimización con la técnica *Monte Carlo*, con lo que se reorienta la posición del ligando. Finalmente, se calculan las energías de unión, de atracción y de repulsión de fuerzas de van der Waals, así como las electrostáticas (E. Mashiach *et al.*, 2010; Efrat Mashiach *et al.*, 2010).

6.2.14 *PyMOL*

Las representaciones gráficas de los modelos y complejos fueron generadas con *PyMol* (Schrödinger, n.d.) (Eargle, Luthey-Schulten, & Wright, 2006; Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996). Para la distribución de cargas en los péptidos y el receptor se usó el plug in *APBS Electrostatics* (Jurrus *et al.*, 2018).

6.2.15 *RING 2.0*

Para la representación de los contactos se empleó el servidor *RING 2.0*, el cual busca contactos y los clasifica según sus características de distancia, átomos que interactúan, energías y geométricas de la unión. Los contactos encontrados se clasifican como interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y apilamientos π - π (Piovesan, Minervini, & Tosatto, 2016).

6.3 Metodología de modelado

6.3.1 *Modelado por homología de HBD3M y CCR2*

La secuencia de la HBD3M se obtuvo del trabajo de (Ibarra Valencia, 2017), y la secuencia de CCR2 de humano del número de referencia de NCBI [NP_001116513.2](#). Se realizó una búsqueda de secuencias con estructura tridimensional reportada con *BLAST*, Tabla 2, con la base de datos de *Protein Data Bank* (PDB) para seleccionar plantillas para la generación de estructuras por modelado comparativo y se escogieron las de menor valor E, el cual indica la probabilidad de que la secuencia sea tomada al azar, y que también tuvieran mayor identidad y cobertura. Siguiendo este criterio se escogió la estructura dilucidada por resonancia magnética nuclear por Schibli *et al.*, 2002 de la hBD3, pdb id 1kj6. La secuencia de dicho péptido y la de HBD3M es la misma, solo difiere en la cola de

histidinas presente en el N-terminal de este último. Dicha región no se retiró de la secuencia debido a que se ha reportado que HBD3M mantiene actividad quimioatrayente con la cola de histidinas. La estructura tridimensional de la beta defensina HBD3M se realizó por modelado comparativo con *MODELLER*.

Tabla 2. Búsqueda de plantillas por NCBI BLAST de proteínas.

Resultados BLAST para CCR2					
Código PDB	Cadena	Descripción	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)
6GPS	A	Receptor de quimiocinas C-C tipo 2	99	0	86.08
6GPX	A	Receptor de quimiocinas C-C tipo 2	78	0	83.43
5T1A	A	Proteína quimérica CCR2 con lisozima T4	82	1.00E-159	98.7
6MEO	B	Receptor de quimiocinas C-C tipo 5	76	2.00E-159	79.31
6AKX	A	Receptor de quimiocinas C-C tipo 5	82	2.00E-142	62.71
Resultados BLAST para HBD3M					
Código PDB	Cadena	Descripción	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)
1KJ6	A	Beta defensina humana 3	72	6.00E-24	7.78

Debido a que no se cuenta con un modelo tridimensional de CCR2 para realizar el acoplamiento molecular, se generó uno usando como base la entrada 6MEO del *PDB*, que corresponde a la estructura del receptor CCR5 (Shaik et al., 2019). Se muestra el alineamiento de secuencias de aminoácidos en la Figura 5. Esta plantilla se escogió debido a que los demás modelos, de CCR2, tienen ocupación cero en residuos del N-terminal (Anexo I), región importante para la unión con ligandos, mientras que el modelo con la entrada 6MEO sí presenta residuos del N-terminal de CCR5, y el N-terminal y las regiones extracelulares son homólogas. Para esta estructura se generaron 10,000 modelos con *MODELLER* y se realizó la selección del mejor modelo, siguiendo los parámetros mencionados en el siguiente punto, y con éste se realizó un refinamiento de asas con en las regiones extracelulares EC1 y EC3.

T-COFFEE, Version 11.00.d625267 (2016-01-11 15:25:41 - Revision d625267 - Build 507)
 Cedric Notredame
 CPU TIME:0 sec.
 SCORE=993

```

*
  BAD AVG GOOD
*
NP_001116513.2 : 98
6MEO_B         : 99
cons           : 99

NP_001116513.2 MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVILI
6MEO_B         MDY-----QVSSPIYDINYYTSEPCQKINVKQIAARLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVILI

cons           * . . . : * . ** : * : * * * . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NP_001116513.2 LINCKKCLKLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEVWFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFFFII
6MEO_B         LINCKRLKSMTDIYLLNLAISDLFFLLTVPFWAHYAAAQWDFGNTMCQLLTGLYFIGFFSGIFFFII

cons           * * * * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

NP_001116513.2 LLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPR--
6MEO_B         LLTIDRYLAVVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWVAVFASLPGIIFTRSQKEGLHYTCSSHFYSQ

cons           * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * . * * . * * . * *

NP_001116513.2 --GWNHFHTIMRNILGLVLP LLIMVICYSGILKTL LRCRNEKRRHRAVRVIFTIMIVYFLFWTPYN
6MEO_B         YQFWKNFQTLKIVILGLVLP LLVMVICYSGILKTL LRCRNEKRRHRAVRLIFTIMIVYFLFWAPYN

cons           * : * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

NP_001116513.2 IVILLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRSLFHIALGCRIP
6MEO_B         IVLLNTFQEFFGLNCCSSNRLDQAMQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRNYLLVFFQ-----

cons           * * : * * * * * . * * . : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * : : :

NP_001116513.2 LQKPVCGGPGVVRPGKNVKVTTQGLLDGRGKGSIGRAPEASLQKEGA
6MEO_B         -----

cons           
```

Figura 5. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de CCR2 y CCR5. CCR2 con su número de acceso en NCBI y CCR5 con su código de acceso de la PDB, las regiones de interés para el acoplamiento molecular con CCR2 están subrayadas. Tienes una con una delección respecto al templado, y el N-terminal es más largo en tu receptor, por lo que no tienes templado para esa región importante para la unión. Lo bueno es que DYDY ya está en la zona para la que sí hay idea.

6.3.2 Selección de los modelos

Se obtuvo el RMSD de la cadena principal (CA, C, N y O), de la plantilla 1kj6, 6MEO y de los modelos generados con *MODELLER* con el programa *ProFit* (Martin & Porter, 2010; McLachlan, 1982). Para encontrar los modelos más estables, con mejor probabilidad de existir, se obtuvo el promedio de valores RMSD, contra las plantillas, y DOPE, y se consideraron los modelos con valores cercanos al promedio

y mediana para el modelo final. De éstos se produjeron gráficas de Ramachandran con el programa *PROCHECK* (Laskowski et al., 1993) y se calculó el porcentaje de error con el software *ERRAT* (Colovos & Yeates, 1993) para así verificar que no existan choques estéricos. De estos modelos se escogió el de mayor calificación *ERRAT* y se verificó que los aminoácidos en las gráficas de Ramachandran estuvieran en las zonas permitidas. Para CCR2 se generaron modelos con el refinamiento de asas para optimizar las asas de EC1 y EC3. Se generaron 500 modelos para cada una con la opción *very_slow* de *MODELLER* para mejorar el rendimiento al aumentar el tiempo de cómputo y así obtener mejores soluciones de las asas. De los nuevos modelos con asas se escogieron aquellos que mejoraran la calificación *ERRAT*. El EC2 no se optimizó para no perder el puente disulfuro C113-C190, ya que este está conservado entre CCR5 y CCR2. Para la selección de los modelos de las asas de EC1 y EC3 se escogieron aquellos con menor *molpdf*, también se tuvo en cuenta el RMSD de cadena principal. Otro factor fue que ciertos modelos de asas eran parecidos entre si con RMSD muy bajos, por lo que se tomaron como asas con patrones similares aquellos con RMSD menor a 0.5 Å y se dio mayor preferencia a los modelos más repetidos.

6.3.3 Minimización de los modelos

Los modelos escogidos pasaron por un proceso de minimización con el programa *GROMACS* (Abraham et al., 2015) se usó el campo de fuerza *Charmm36m* (Huang et al., 2016), el cual está optimizado para proteínas y péptidos intrínsecamente desordenados. Se fijaron los péptidos y proteínas desde su centro de masa al centro de una caja cúbica de 1 nanómetro de distancia del centro a los lados, se protonaron los N- y C-terminal, se introdujeron los puentes disulfuro del péptido y el receptor. Posteriormente, se agregó solvente con un modelo de moléculas de agua TIP3P en el que las moléculas de agua están rígidas y se establece las cargas del oxígeno e hidrógenos (Berendsen, Postma, van Gunsteren, & Hermans, 1981). Las cargas se neutralizaron con iones cloro, la cantidad de iones dependió de la carga neta del péptido, además de esto se agregó 0.15 M de iones de sodio y cloro a la solución. Se realizó la minimización de las moléculas hasta que la fuerza máxima fue de 1,000

$\frac{kJ}{mol \cdot nm}$ para relajar las cadenas laterales. Se empleó el esquema de corte Verlet, *steepest descent* con el algoritmo CG, cada paso de 0.0015 kJ, tolerancia de 1000 kJ y 5000 pasos como máximo, corte electrostático de rango corto ($r_{coulomb} = 1\text{ nm}$), corte de van der Waals de rango corto ($r_{vdw} = 1\text{ nm}$) y condiciones periódicas a la frontera.

6.4 Metodología del acoplamiento molecular

6.4.1 Condiciones de acoplamiento molecular

Para el acoplamiento se utilizó *PIPER* a través de *ClusPro* (Katebi, Kloczkowski, & Jernigan, 2010; Vajda et al., 2017). Este se realizó de tres maneras, un acoplamiento sin restricciones, otro teniendo las regiones transmembranales e intracelulares del receptor como repulsivos y un último como el anterior, pero en el que se estableció a las regiones extracelulares del receptor como atractivos. Esto se hizo para cada caso y para los péptidos con sitios de unión conocidos se hizo un acoplamiento local como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Interacciones entre hBD6 y CCR2 (De Paula et al., 2013; Hemmerich et al).

	Ligando	CCR2
CCL2	Y13, K18, K19, R24, K35, K38, K49	D25, Y26, D27, Y28
hBD6	F1, F2, D3, E4, K5, C6, K14, N15, L26, C27, Q28, K29	V20, T21, T22, F23, F24, D25, Y26, D27, Y28

6.4.2 Identificación de residuos activos en la unión

Con *g_mmpbsa* se obtuvieron las aportaciones energéticas residuo por residuo, y de esta manera se encontraron los residuos que se activan durante la unión, ya sea que aporten energía libre positiva negativa a la unión. También se complementó con mapas de incidencia de contactos realizado con el servidor *Prodigy* para así encontrar que contactos son más frecuentes entre los complejos. Finalmente, se escogieron los residuos que aparecen activados durante la unión y se emplearon para el reacoplamiento.

6.4.3 Reacoplamiento molecular e identificación de poses

Con la identificación de los residuos activos se hizo un reacoplamiento local con *HADDOCK* para así poder identificar las posibles poses de los péptidos al unirse con el receptor. Los mejores complejos, según *HADDOCK*, se usaron para

encontrar las orientaciones más favorables en la unión de CCR2 a los ligandos. Los residuos con mayor contribución de energía libre, tanto positiva como negativa, se consideraron como “activos” durante el acoplamiento y los demás como “pasivos” con excepción de las regiones transmembranales e intracelulares de CCR2. *HADDOCK* clasifica los complejos generados en conjuntos (clúster) de acuerdo con sus características como energías de vdW, electrostáticas, desolvatación y unión, además del RMSD, calculado a partir del complejo con menor energía, para encontrar los complejos más parecidos en su distribución espacial. Basado en esto, el programa calcula el valor-Z, el cual entre más negativo implica a un mejor conjunto de complejos. De los resultados obtenidos se escogieron los conjuntos con un valor-Z negativo, de los que se analizó el mejor complejo, complejo 1 del conjunto. Se obtuvieron los mapas de contactos con el servidor *CoCoMaps* y las aportaciones de energía libre residuo por residuo con *g_mmpbsa*. También dada la importancia de los residuos D25, Y26, D27 y Y28 de CCR2, se descartaron aquellos complejos en los cuales estos no tuvieran contacto con residuos del ligando.

7 Resultados

7.1 Modelado por homología

Del modelado por homología con *MODELLER* se obtuvieron los datos de la Figura 6. Se escogieron modelos con valores DOPE y de RMSD cercanos al promedio y mediana y dentro de la distribución normal, y de estos modelos se obtuvieron gráficos de Ramachandran y el valor *ERRAT*. Se seleccionaron aquellos con los mejores gráficos y calificaciones *ERRAT*.

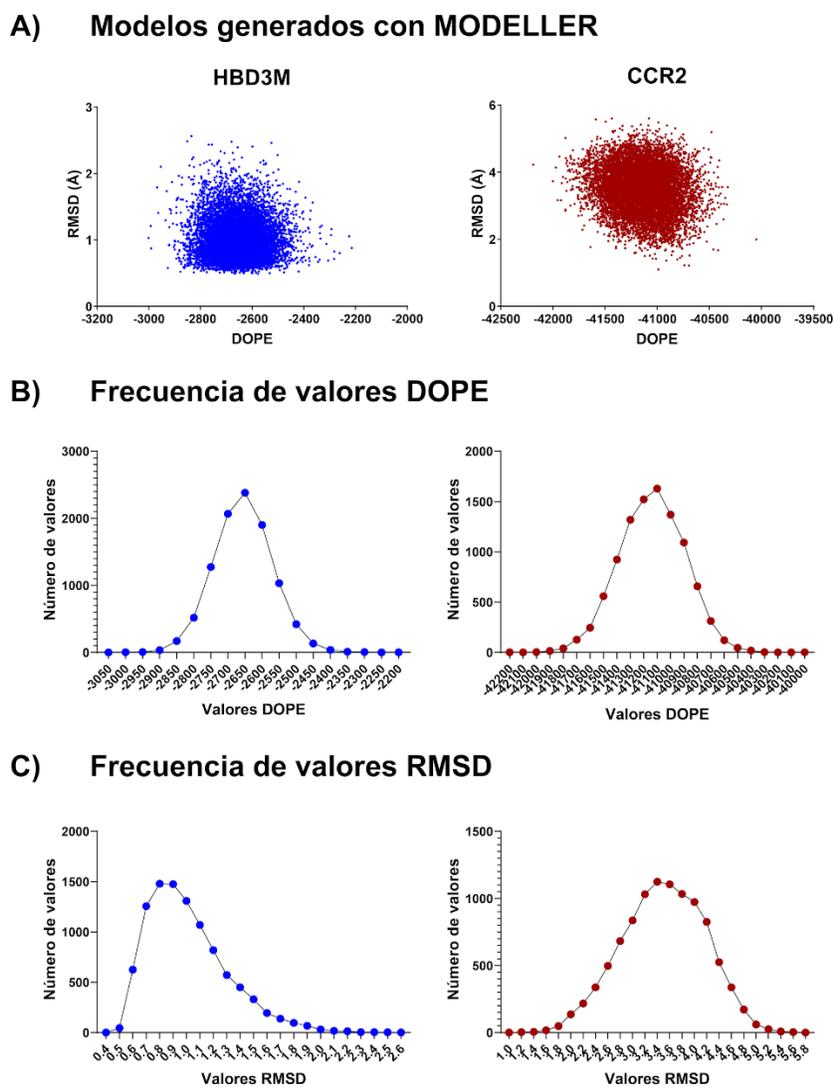


Figura 6. Incidencia de valores DOPE y RMSD. En color azul los valores para HBD3M y en rojo para CCR2.

En la Tabla 4 y en la Figura 7 se muestran los modelos obtenidos después de la selección y más adelante se discuten los valores *ERRAT* y de energía DOPE de estos, así como sus cambios después del refinamiento de asas y minimización de energía.

Tabla 4. Selección de modelos generados por homología. La tabla muestra los modelos con mejor calificación *ERRAT* de los seleccionados de acuerdo con su calificación DOPE y a su RMSD respecto a la plantilla. También se muestra el promedio y mediana de los valores DOPE y RMSD para los dos casos.

Modelos para HBD3M					
Modelo	DOPE	RMSD	<i>ERRAT</i>	DOPE	
hbd3m.B99997323.pdb	-2655.72	1.031	71.4286	Promedio	-2654.77
hbd3m.B99993232.pdb	-2654.69	1.108	57.5000	Mediana	-2655.18
hbd3m.B99998270.pdb	-2654.68	1.094	48.5714	RMSD	
hbd3m.B99995888.pdb	-2654.87	1.046	46.5116	Promedio	1.012618
hbd3m.B99991588.pdb	-2655.59	0.990	40.0000	Mediana	0.959000

Modelos para CCR2					
Modelo	DOPE	RMSD	<i>ERRAT</i>	DOPE	
ccr2.B99993498.pdb	-41139.1	3.626	81.5873	Promedio	-41138.0
ccr2.B99995453.pdb	-41136.1	3.271	81.3084	Mediana	-41134.2
ccr2.B99998480.pdb	-41136.5	3.456	81.3115	RMSD	
ccr2.B99993220.pdb	-41141.2	3.589	81.4330	Promedio	3.494253
ccr2.B99993461.pdb	-41138.3	3.574	79.6238	Mediana	3.511000

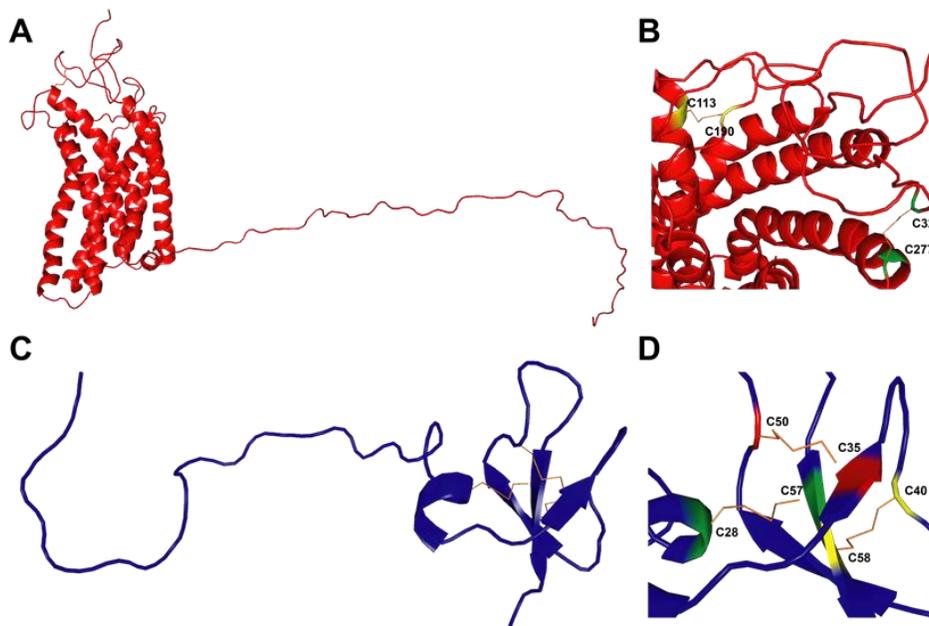


Figura 7. Modelos generados por homología. Representaciones de caricatura con puentes disulfuro marcados con líneas naranjas de A), B) CCR2, N-ter representado con color verde y C), D) hBD3M.

7.2 Refinamiento de asas

Las asas a optimizar con *MODELLER* fueron las de las regiones EC1 y EC3, del residuo N104 al N110 para EC1 y de F268 a N276 para EC3. De cada asa se hicieron 500 modelos con la opción *very_slow* para su refinamiento. Para seleccionar los nuevos modelos se emplearon aquellos con menor *molpdf*, después se obtuvo el RMSD de cadena principal con respecto al modelo original y posteriormente con aquellos seleccionados por *molpdf* para revisar patrones similares. Se reconocieron los patrones más repetidos, aquellos con RMSD menor a 0.5 Å entre sí. Finalmente se seleccionó a aquel dentro del patrón más repetido y con mejor calificación *ERRAT*.

Para EC1 se reconocieron seis patrones parecidos, de estos se escogió el más representativo, en el cual hubo 98 modelos semejantes. Este nuevo modelo tiene un RMSD de cadena principal de 1.671 Å y de cadena lateral de 4.277 Å con respecto al modelo original. En los nuevos modelos de EC3 solo se reconoció un grupo con 15 miembros, el modelo escogido tiene un RMSD de cadena principal de 3.962 Å y de cadena lateral de 5.706 Å (Figura 8). Los valores *ERRAT* se muestran en la Figura 11, donde se observa una mejora en el valor *ERRAT* de estas dos asas.

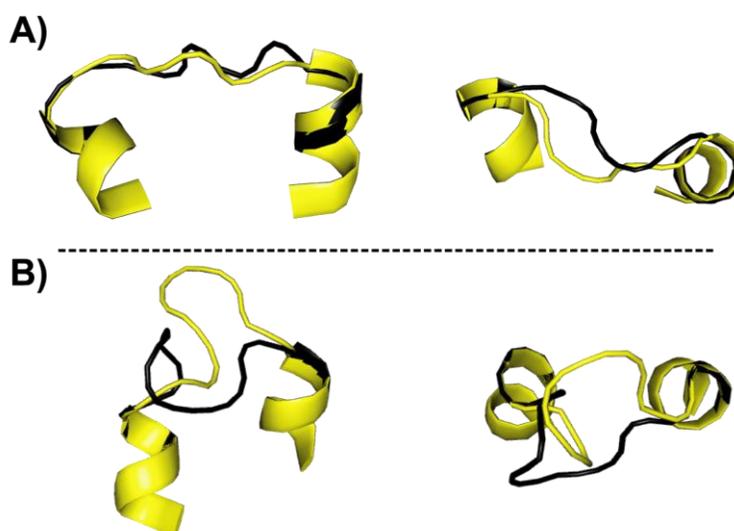


Figura 8. Refinamiento de asas. A) EC1 y B) EC3. Se muestran dos vistas de los modelos. En negro antes del refinamiento y en amarillo después del refinamiento.

7.3 Minimización de energía

Los modelos creados por homología y los demás ligandos para el receptor, hBD6 y CCL2 fueron minimizados como se indica en el apartado de metodología. De CCR2 se eliminaron los residuos 321-374 para facilitar la minimización. En las Figuras 9-12 se muestran los cambios en energía DOPE, calificación *ERRAT* y gráficos de Ramachandran de los modelos, antes y después de la minimización de energía y del refinamiento de asas. Los cambios de los demás ligandos se encuentran en el Anexo II. Por otro lado, tras la minimización se puede observar cómo los cambios son más claros para HBD3M, ya que se observa una disminución de energía en todo el péptido. Esto también se refleja en el aumento de la calificación *ERRAT*, indicando así menor presencia de choques estéricos. Finalmente, cabe mencionar que después del refinamiento de asas de CCR2 se observa un cambio mínimo en energía DOPE, pero una mejor calificación *ERRAT*. También se puede observar que el refinamiento de las asas de EC1 y 3 disminuyó la presencia de choques estéricos en EC2 según *ERRAT*.

El movimiento de las cadenas principal y laterales de los modelos de HBD3M y CCR2 se describe como RMSD en la Tabla 5 y se muestra en las Figuras 13 y 14. Para CCR2 se evaluó el RMSD de la proteína completa y de las regiones de interés individualmente. De los demás ligandos solo se vio mejorada la calificación *ERRAT* de 1kj6 (hBD3), mientras que 3ifd (CCL2) y 2lwl (hBD6) presentaron cambios mínimos.

Tabla 5. RMSD de cadena lateral y principal después de la minimización de energía.

	RMSD (Å)	
	Cadena principal	Cadena lateral
hBD3M	0.365	0.516
CCR2	0.231	0.371
• N-ter	0.237	0.450
• EC1	0.212	0.315
• EC2	0.232	0.360
• EC3	0.252	0.367

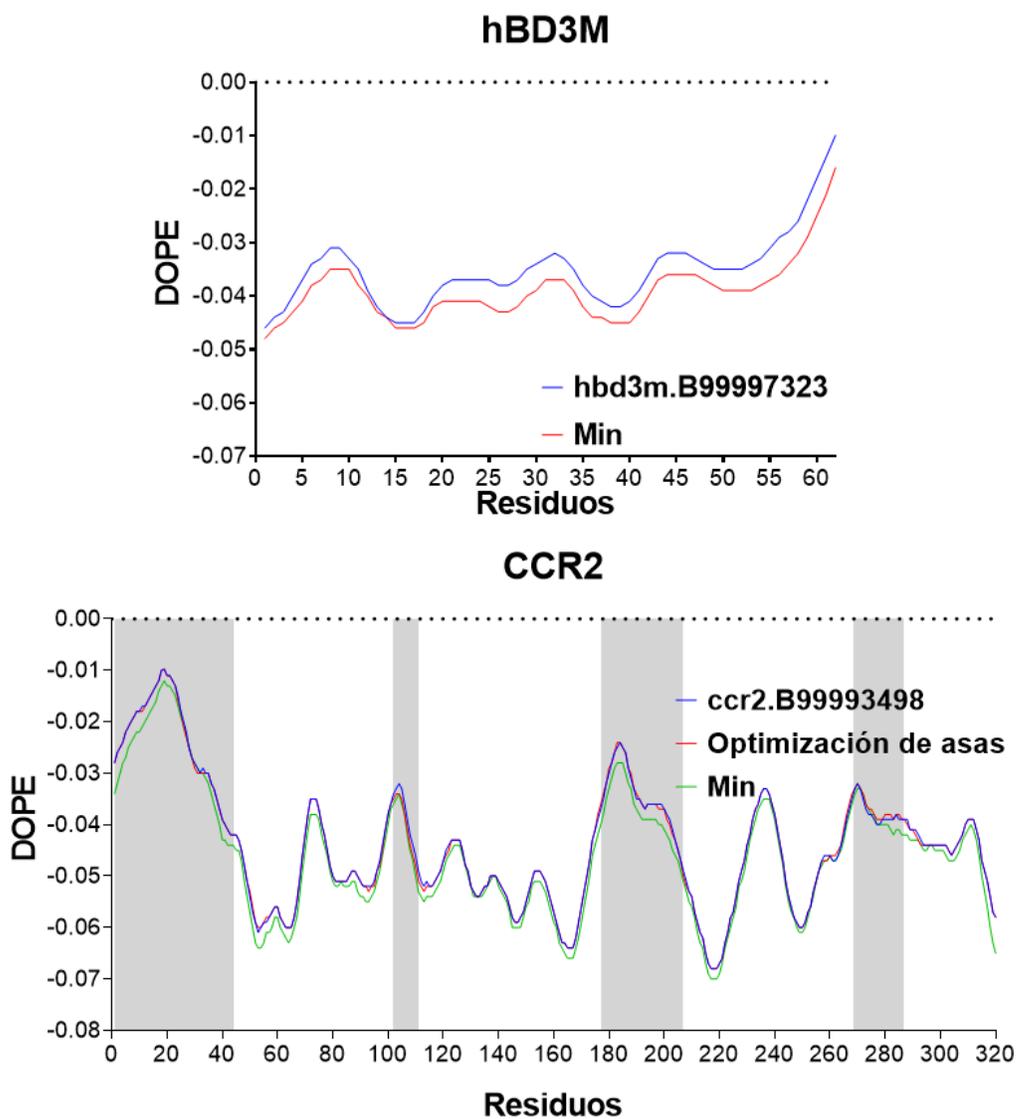


Figura 9. Cambios de energía en los modelos generados por homología. Cambios en energía DOPE según *MODELLER* de HBD3M y CCR2. El nombre antes de los cambios se mantiene como lo dio *MODELLER*, Min indica el cambio después de la minimización de energía. En CCR2 las zonas sombreadas indican las regiones extracelulares.

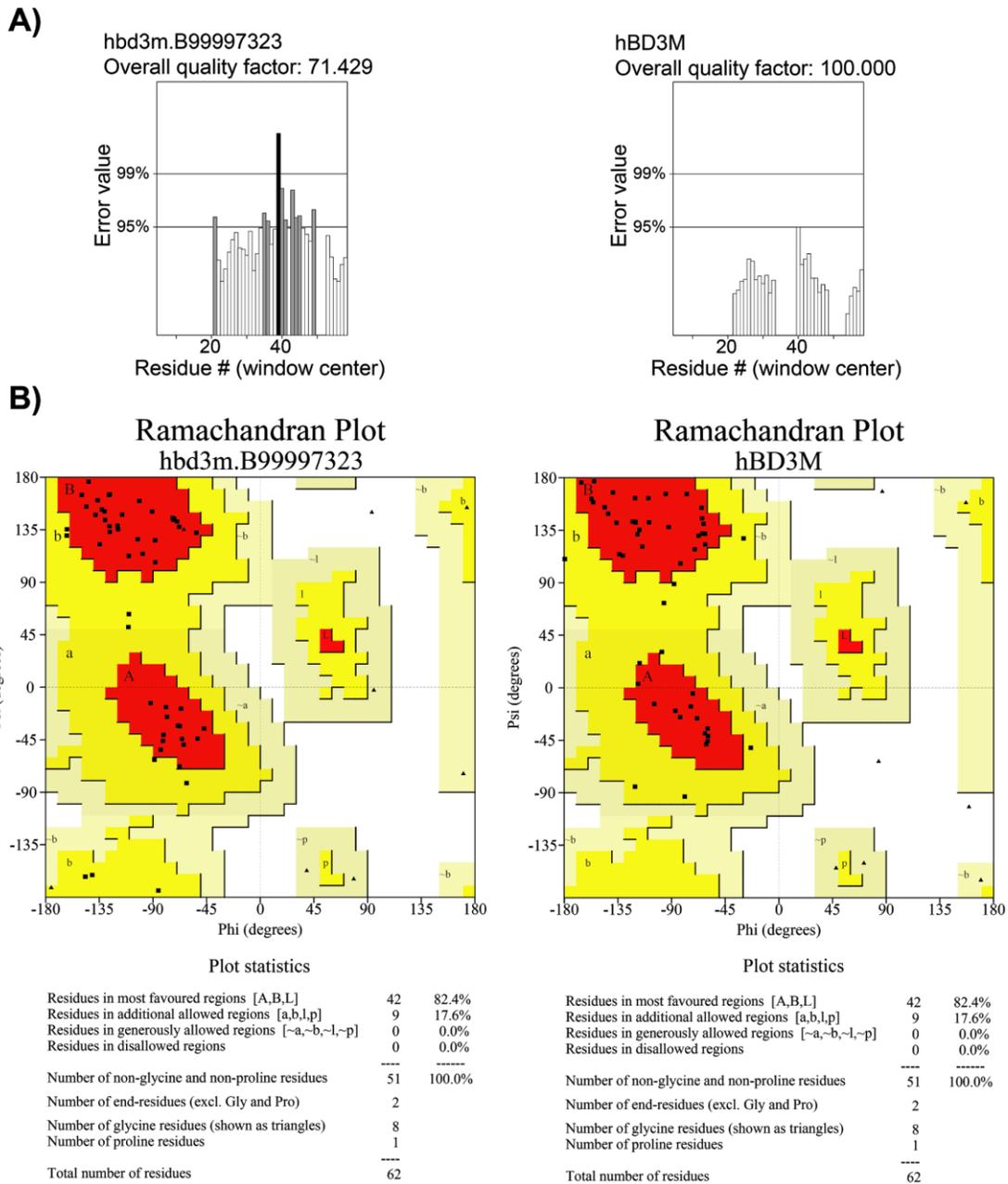


Figura 10. Evaluación ERRAT y gráficos de Ramachandran de HBD3M. Se muestran las evaluaciones ERRAT (A) y los gráficos de Ramachandran (B) del modelo obtenido por homología para hBD3M (hbd3m.B99997323) y el mismo después de la minimización de energía (HBD3M).

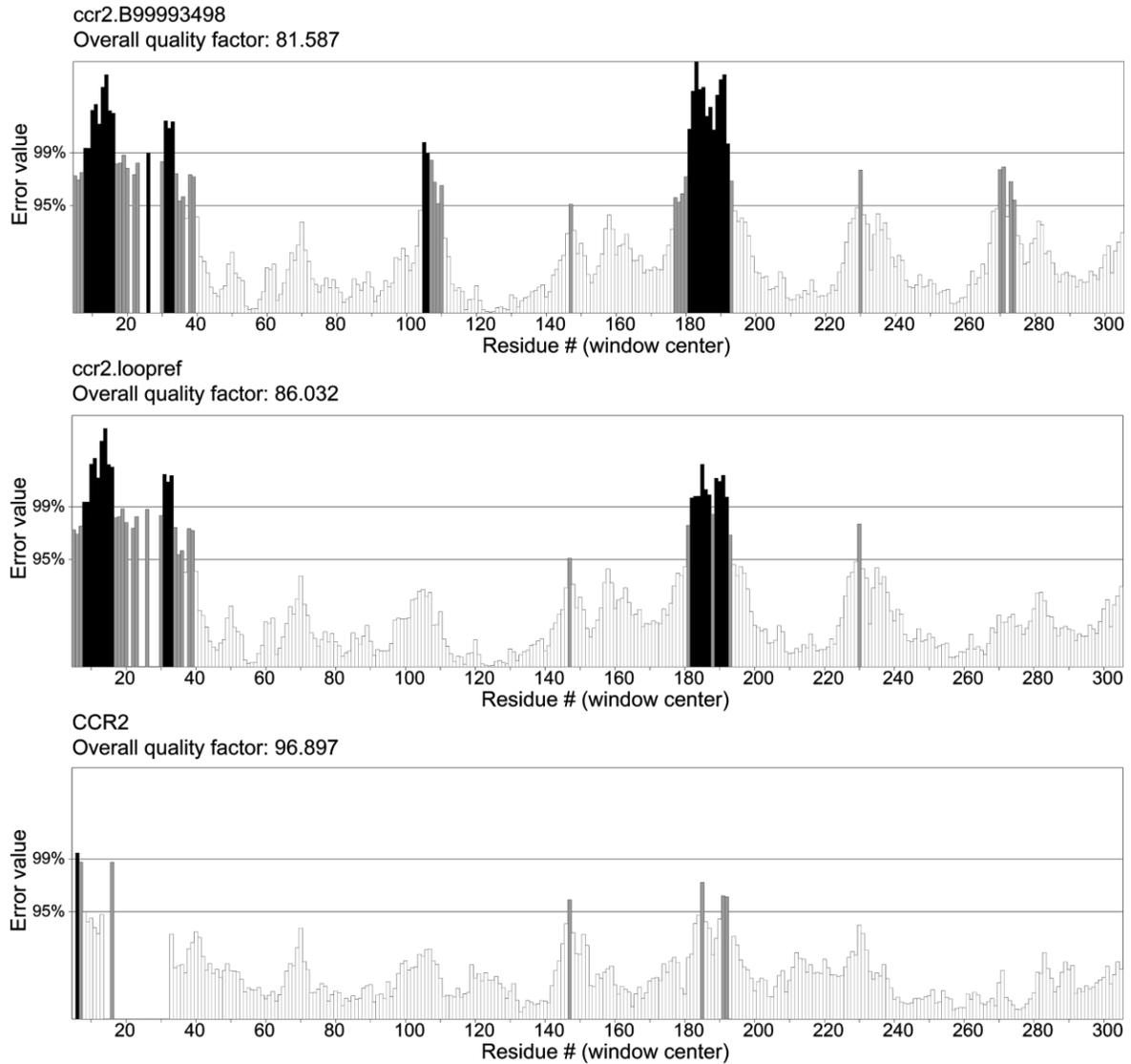


Figura 11. Evaluación ERRAT de los modelos para CCR2. Calificación ERRAT del modelo obtenido por homología para CCR2 (ccr2.B99993498), del mismo después del refinamiento de las asas de EC1 (residuos 101 - 114) y EC3 (residuos 269 - 285), y del modelo final después de la minimización de energía.

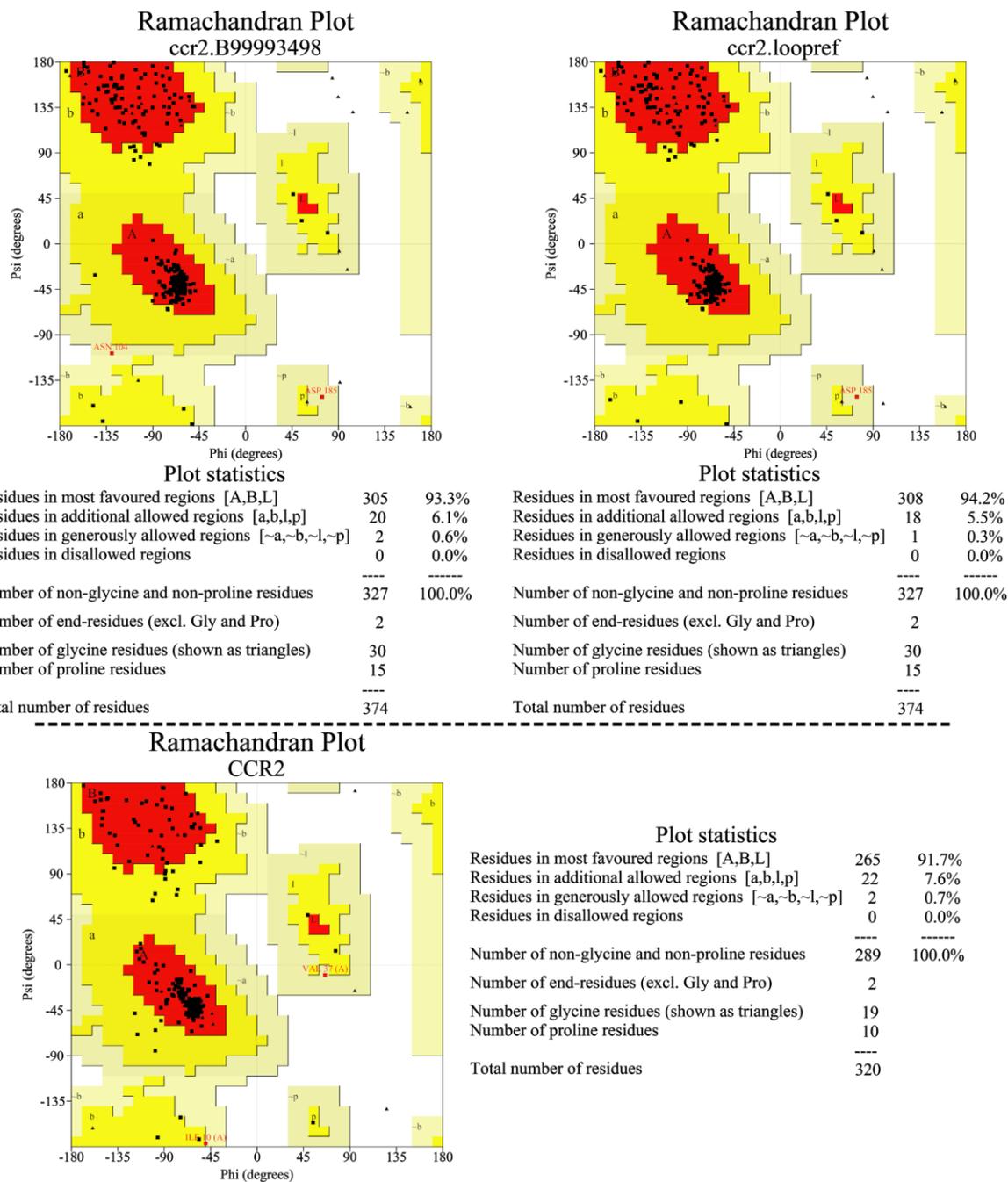


Figura 12. Gráficos de Ramachandran de los modelos para CCR2. Gráficos de Ramachandran del modelo obtenido por homología para CCR2 (crr2.B99993498) y del modelo después del refinamiento de las asas de EC1 y EC3 (crr2.loopref) y del modelo final después de la minimización de energía (CCR2).

hBD3M

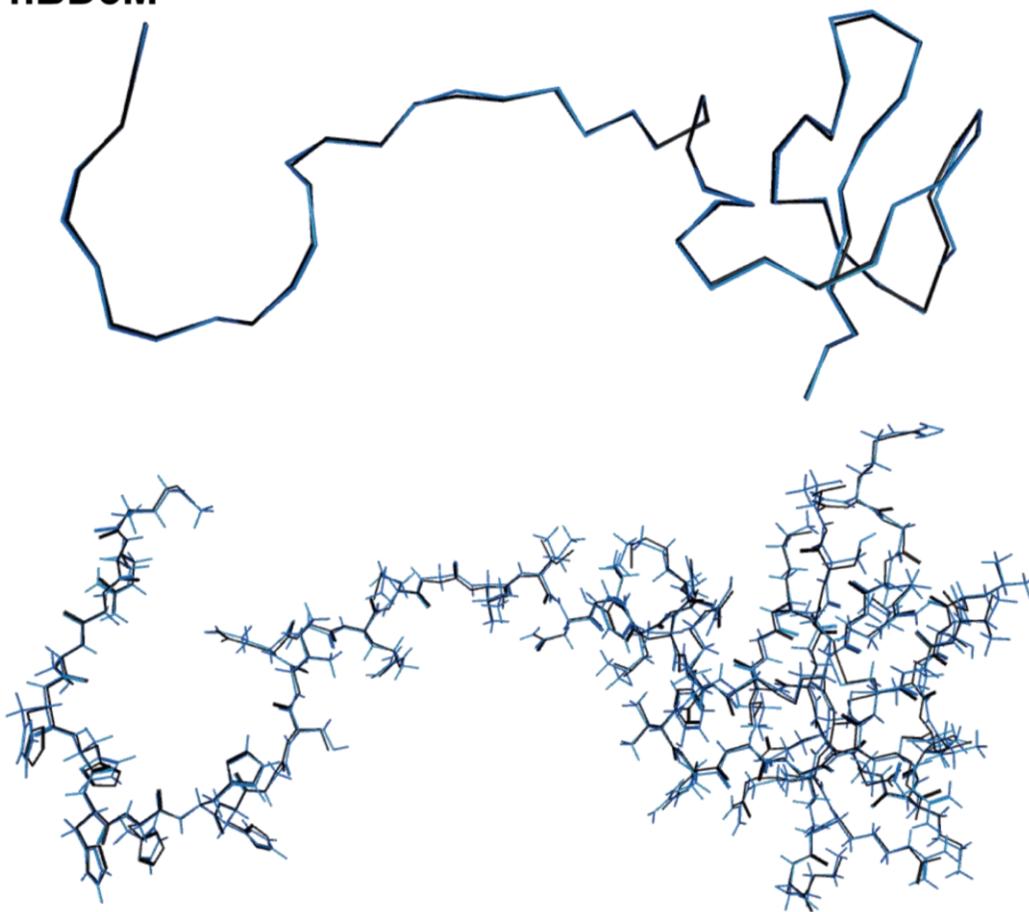


Figura 13. Minimización de energía del modelo para hBD3M. En negro se muestra el modelo antes y en azul el modelo después de la minimización.

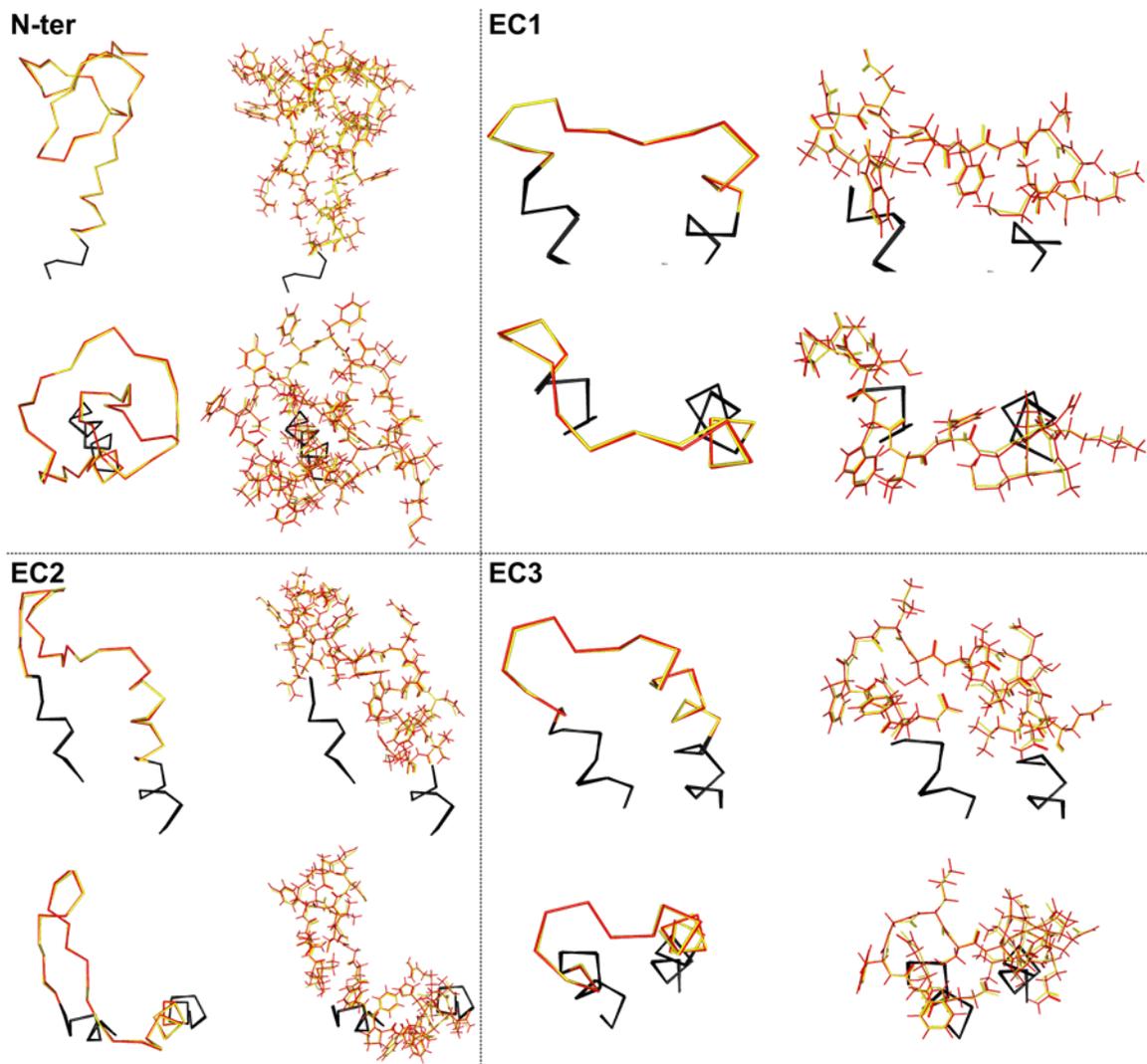


Figura 14. Minimización de energía del modelo para CCR2. En amarillo se muestra el modelo antes y en rojo después de la minimización. Se muestran las regiones de interés N-ter, EC1, EC2 y EC3.

7.4 Acoplamiento molecular

Para hacer un muestro general de los patrones de unión se realizaron tres acoplamientos globales con *ClusPro* para cada ligando, CCL2, hBD6, hBD3 y hBD3M y uno local para CCL2 y hBD6, pues sus sitios de unión ya están identificados. En la Tabla 6 se describen los acoplamientos:

Tabla 6. Nomenclatura para acoplamientos con ClusPro.

Acoplamientos	
Global	
Glo	No se designaron residuos atractivos ni repulsivos.
Rep	Se designo a las regiones transmembranales e intracelulares del receptor como repulsivas
Atrep	Se designaron a las regiones transmembranales e intracelulares del receptor como repulsivas y al ligando como atractivo
Local	
CCL2	Residuos atractivos según la tabla 4 y regiones
hBD6	transmembranales e intracelulares del receptor como repulsivos

La intención de estos tres modos para el acoplamiento global fue determinar si los ligandos se pueden unir al receptor al encontrarse sin restricciones de unión, esto para el acoplamiento Glo. Con el acoplamiento Rep y Atrep se buscó hacer una búsqueda más limpia, siendo que las regiones transmembranales no entran en contacto con el ligando en la primera fase de la unión. El acoplamiento local solo se usó para compararlo con los acoplamientos globales. En el acoplamiento Glo se obtuvieron complejos en los que el ligando interactúa con cualquier parte del receptor menos la región de interés. Sin embargo, en el conjunto de complejos VdW+Eelec se encontraron complejos en los que la unión se da con la región extracelular, esto puede dar a entender que la unión de CCR2 a los ligandos se da por fuerzas electrostáticas.

7.4.1 *Mapas de incidencia de contactos*

Con el fin de encontrar cuales residuos tenían contacto entre los ligandos y el receptor, y así determinar con esto la incidencia de estos en cada conjunto, se hicieron mapas de interacción con *Prodigy*. Se muestran los contactos de los tres

acoplamientos globales en una sola matriz, Figura 15. Se muestran también los mapas de incidencia de cada conjunto obtenido con *ClusPro*, Figura 16. En el caso de CCL2 se observan patrones similares en los acoplamientos globales y locales. Se puede observar mayor frecuencia de contactos por parte de CCR2 en el N-terminal, especialmente en los residuos D25, Y26, D27 y Y28. En EC2 se ve mayor presencia de contactos alrededor del residuo R196, mientras que, en EC3 se aprecian contactos en gran parte de esa región. Se puede apreciar también que EC1 tiene menor presencia al formar contactos con CCL2. Por parte de CCL2 se observa mayor frecuencia de contactos en la región próxima al N-terminal y alrededor de los residuos cargados R14, K15, R20, R25, R26, K31, K34, E35, K40, K45 y E46.

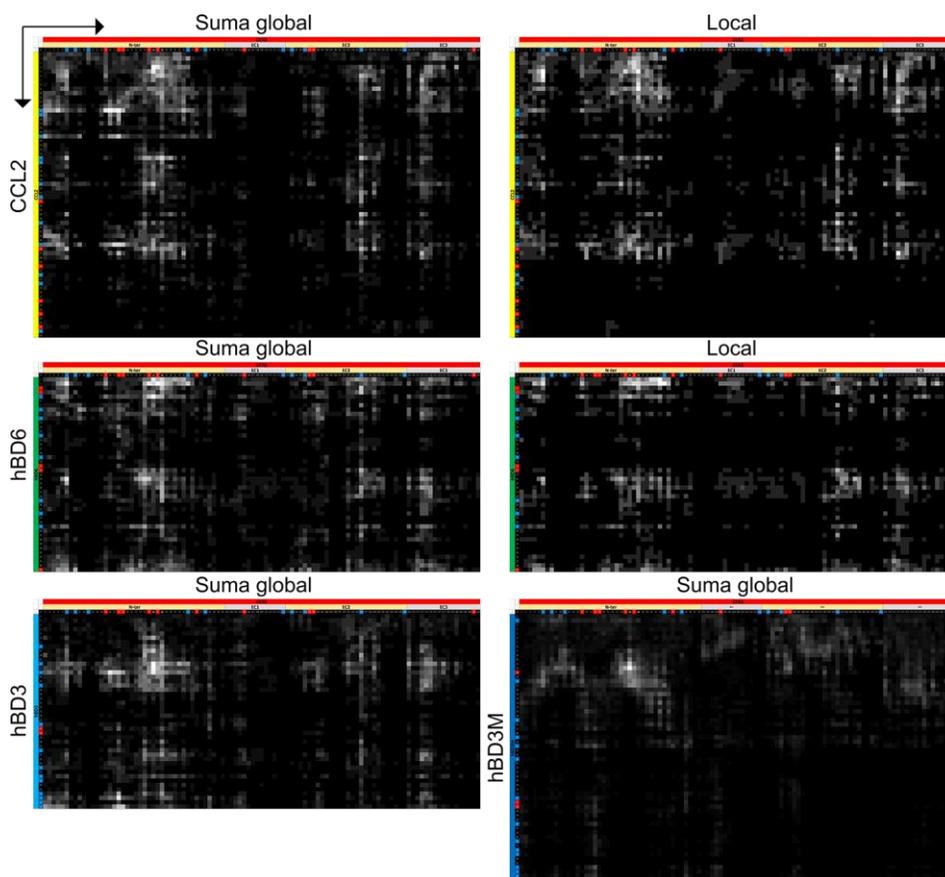


Figura 15. Mapas de incidencia de contactos, suma global y local. Se muestran mapas con la suma de contactos de los acoplamientos globales y el acoplamiento local para CCL2 y hBD6. Los mapas están representados en una escala de negro: cero incidencia, hasta blanco: mayor incidencia de contacto. Los puntos azules y rojos representan residuos con carga positiva y negativa, respectivamente. Los residuos correspondientes a CCR2 se muestran con rojo en la parte superior y las regiones extracelulares de diferenciación con colores beige y gris intercalados (N-ter, EC1, EC2 y EC3). Los residuos de los ligandos se muestran igualmente representados por colores del lado izquierdo: amarillo para CCL2, verde para hBD6, cian para hBD3 y azul para hBD3M.

Para hBD6 se muestra un patrón de interacción similar al que presenta CCL2 con CCR2. Se observa que los residuos con carga positiva y negativa participan en la formación de contactos. Se puede mencionar también la existencia de una mayor contribución por parte de la región más cercana al N-terminal de hBD6, siendo esta de M1 a K10, igualmente con la región entre los residuos E21 y K29, el residuo R35 y la región cercana al D45, además del C-terminal.

En el caso de hBD3 y hBD3M se repite el mismo patrón de interacción con CCR2 y se observa que las regiones entre residuos positivos en ambos péptidos tienen mayor peso en la unión que la región con cargas negativas. Se observa también cómo la cola de histidina entorpece la unión con la región original del péptido, aunque los modelos del conjunto glo de hBD3M presentan un mismo patrón de incidencias que hBD3. También se puede apreciar que la región del receptor con los residuos D25, Y26, D27 y Y28 es la que tiene mayor incidencia de contactos, resaltando así la importancia del N-terminal en la unión a ligandos.

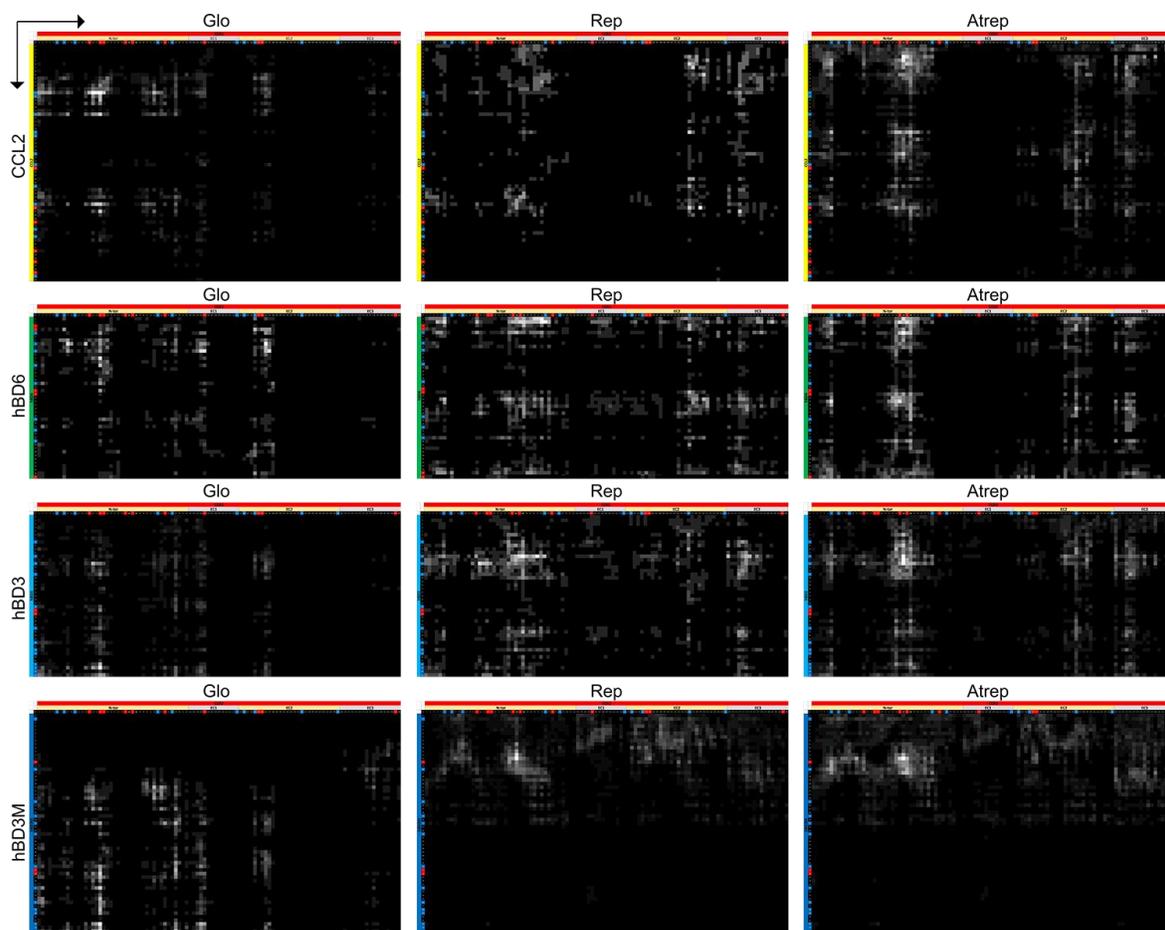


Figura 16. Mapas de incidencias de contactos individuales. Se muestran los mapas para cada conjunto obtenido con *ClusPro*. Los mapas están representados en una escala de: negro, para cero incidencia, a blanco, para la mayor incidencia de contactos. Los puntos azules y rojos representan residuos con carga positiva y negativa, respectivamente. Los residuos correspondientes a CCR2 se muestran con rojo en la parte superior y las regiones extracelulares se diferencian con colores beige y gris intercalados (N-ter, EC1, EC2 y EC3). Los residuos de los ligandos se muestran igualmente representados por colores del lado izquierdo: amarillo para CCL2, verde para hBD6, cian para hBD3 y azul para hBD3M.

En la Figura 16 se puede apreciar que la cola de histidinas de hBD3M no interfiere en el acoplamiento sin restricciones de este e incluso se presenta un patrón similar al de hBD3. Puesto que se emplearon los modelos en el conjunto VdW+Elec, se puede recalcar nuevamente que la naturaleza de las uniones CCR2-peptidos ligandos se debe meramente a fuerzas de van der Waals y electrostáticas, las cuales son dadas por los residuos hidrofóbicos y cargados. También se puede considerar que en el caso de hBD3M es importante la posición del péptido, al ser un péptido más grande y con cola de histidinas, al entrar en contacto con el receptor.

7.4.2 Aportaciones energéticas

Para determinar cómo influyen los residuos del receptor y los ligandos en los complejos generados se empleó *g_mmpbsa* y se calculó la energía libre de cada residuo en los complejos. En las Figuras 17 – 20 se muestran las contribuciones de energía libre del receptor CCR2 acoplado con cada ligando. Se aprecia que en todos se comporta de manera similar, ya que hay mayor aportación a la unión por parte del N-terminal, después del EC2, seguido del EC3 y EC1. Este último presenta la menor aportación de energía libre de las cuatro regiones extracelulares. Para determinar qué residuos participan en la unión con los ligandos se obtuvo el promedio, desviación estándar y valores máximos y mínimos de energía libre de cada residuo. Se descartó a aquellos cuyo promedio fuera cero, a menos que la desviación estándar fuera mayor a 8, ya que algunos residuos aportan energía libre positiva o negativa en diferentes complejos del mismo ligando.

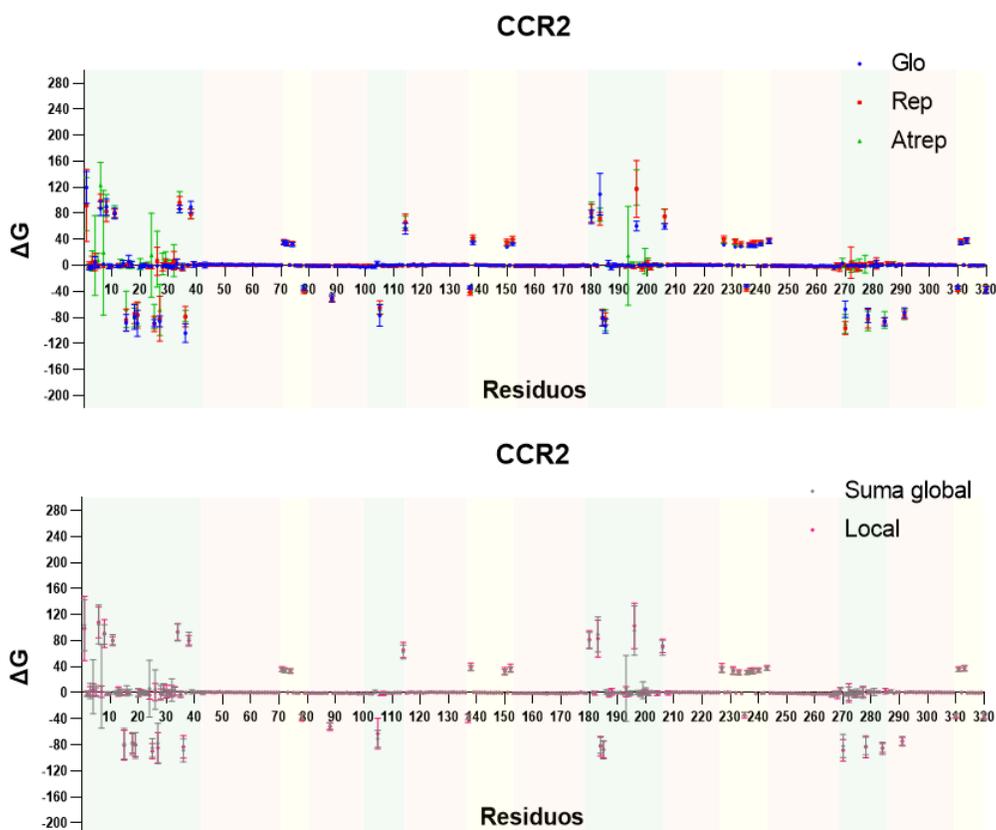


Figura 17. Aportaciones energéticas de CCR2 al complejo CCR2xCCR2. Se muestran los valores en kJ/mol promedio, máximos y mínimos de energía libre de cada residuo. Los colores en el fondo representan las regiones del receptor: verde para las regiones extracelulares, naranja para las regiones transmembranales y amarillo para las regiones intracelulares.

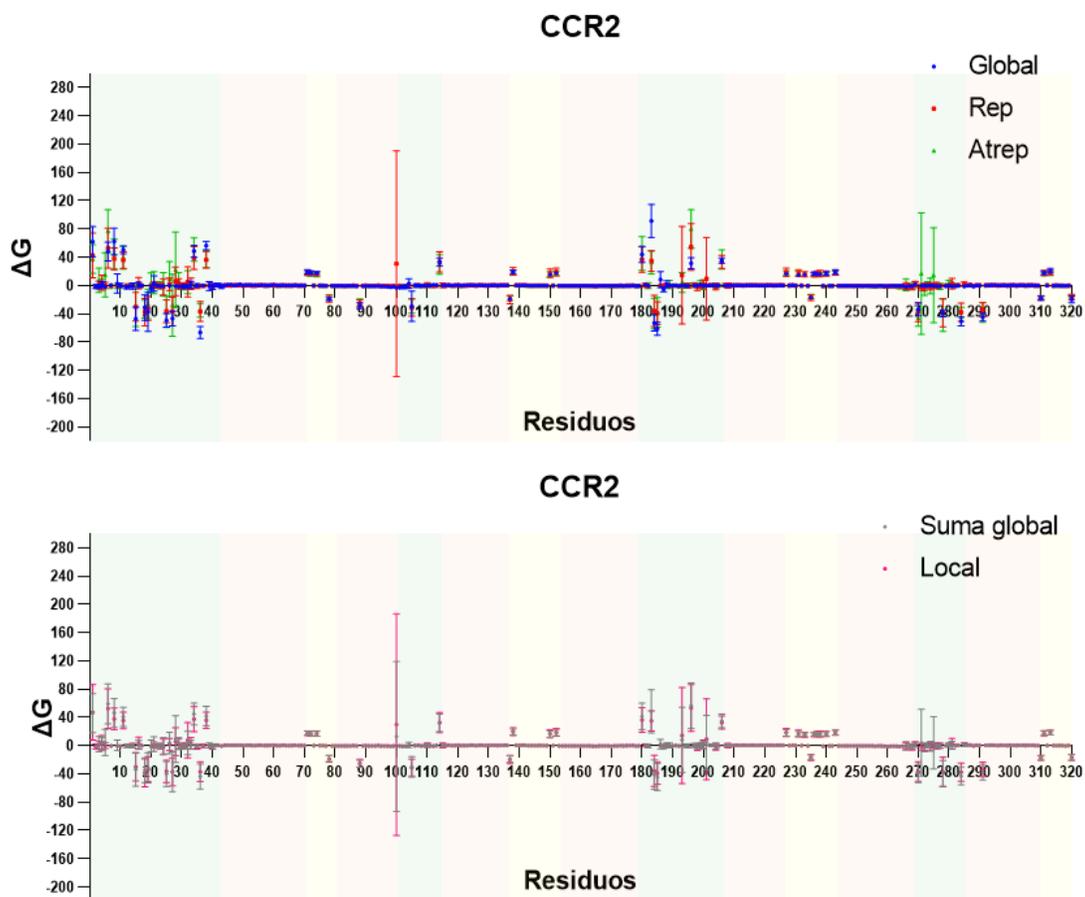


Figura 18. Aportaciones energéticas de CCR2 al complejo CCR2xhBD6. Se muestran los valores en kJ/mol promedio, máximos y mínimos de energía libre de cada residuo. Los colores en el fondo representan las regiones del receptor: verde para las regiones extracelulares, naranja para las regiones transmembranales y amarillo para las regiones intracelulares.

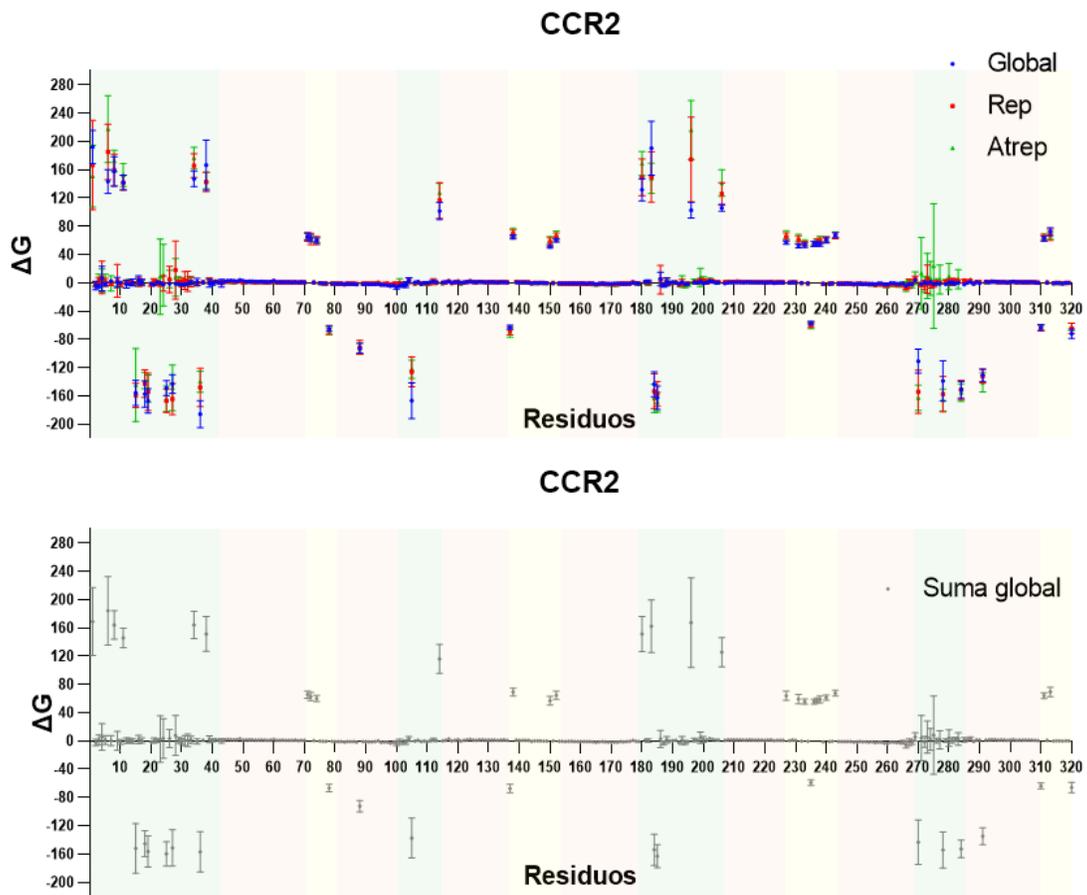


Figura 19. Aportaciones energéticas de CCR2 al complejo CCR2xhBD3. Se muestran los valores en kJ/mol promedio, máximos y mínimos de energía libre de cada residuo. Los colores en el fondo representan las regiones del receptor: verde para las regiones extracelulares, naranja para las regiones transmembranales y amarillo para las regiones intracelulares.

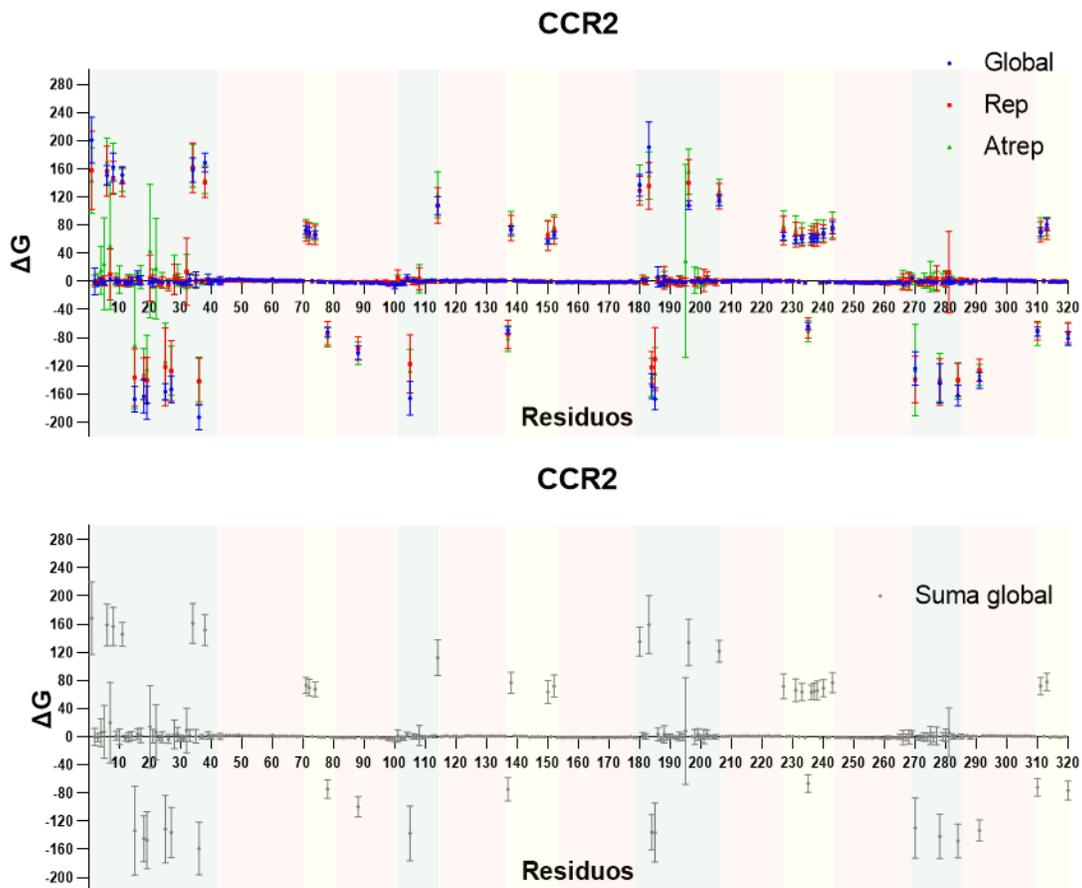


Figura 20. Aportaciones energéticas de CCR2 al complejo CCR2xhBD3M. Se muestran los valores en kJ/mol promedio, máximos y mínimos de energía libre de cada residuo. Los colores en el fondo representan las regiones del receptor: verde para las regiones extracelulares, naranja para las regiones transmembranales y amarillo para las regiones intracelulares.

Los residuos seleccionados como “activos” durante la unión se presentan en la Tabla 7. Ahí se observa que los residuos del receptor con carga positiva aportan energía libre positiva a la unión, mientras que los de carga negativa aportan energía libre negativa. Para los ligandos las aportaciones energéticas se presentan en las Figuras 21 – 24 y los residuos seleccionados como “activos” durante el acoplamiento se presentan en la Tabla 9.

Tabla 7. Residuos de CCR2 con mayor contribución energética a los complejos con los ligandos. En la parte superior se encuentran residuos del N-terminal y en la inferior de las regiones EC1, 2 y 3. Unidades en kJ/mol. Para mejor distinción se emplearon esquema de colores, en promedio los valores positivos se muestran en verde y los negativos en rosa, para desviación estándar se muestra una escala de color azul, a mayor intensidad más grande la desviación estándar.

Residuos CCR2		M1	S3	T4	S5	R6	S7	R8	R11	E15	E18	E19	F24	D25	Y26	D27	Y28	C32	K34	D36	K38			
CCL2	Global	Prom	104	2.6	4.31	2.39	105	1.57	89.6	80.8	-79	-79	-81	6.16	-85	4.95	-78	0.03	3.89	92.7	-89	83.3		
		Dvst	39.2	11.8	10.4	8.65	29.6	8.12	15.1	8.49	23.2	16.1	19.9	43.5	14.5	29.9	30.5	11.4	17.4	12.9	17.6	9.41		
		Max	220	57.7	40.2	36.1	228	50.6	130	101	-12	-39	-16	273	-14	230	59.7	42.7	127	135	-59	104		
		Min	49.3	-6.6	-7	-5.7	72.4	-3.2	63.8	58.5	-118	-127	-121	-29	-111	-18	-114	-18	-4.9	76.4	-134	62.1		
	Local	Prom	98.9	2.56	4.05	1.36	108	1.35	91.1	79.8	-81	-77	-80	-3.6	-90	1.03	-85	-1.8	2.23	93.7	-83	80		
		Dvst	48.8	6.65	9.93	5.97	23.4	8.83	21.2	6.33	22.7	15.8	18.2	6.04	11.4	13.2	23.2	7.68	16.6	15.5	16.8	8.14		
		Max	223	32.4	40.2	19.4	158	42.2	150	97.1	-22	-56	-50	7.91	-53	64.6	1.62	27.5	43.6	133	-64	96.3		
		Min	49.3	-3.8	-2.8	-5.7	66	-3.3	65.9	67.2	-118	-123	-104	-19	-105	-10	-114	-13	-4.9	68.7	-130	67.8		
	hBD6	Global	Prom	46	2.18	2.9	4.24	59	-0.5	46.2	40.7	-34	-35	-32	-0.5	-40	3.58	-37	9.22	3.5	44.9	-44	41.8	
			Dvst	27.3	10.7	8.36	18.6	28.2	1.72	20.5	13.4	23.4	17.3	21.1	11.7	17.4	14.9	28.3	32.9	16.6	15.5	17.4	13.5	
			Max	137	72.5	42.5	127	150	4.82	103	66.3	52	7.6	16.2	47.4	14.6	86.2	105	185	108	88.7	-11	69.2	
			Min	5.86	-6.8	-9.5	-8.1	6.19	-5	9.17	2.5	-68	-86	-73	-27	-74	-17	-68	-20	-4.1	5.32	-82	8.12	
Local		Prom	47.4	1.09	4.14	-0.1	52.3	-0.3	37.9	35.4	-30	-39	-33	-1.7	-36	1.88	-37	5.55	7.57	37.2	-37	35.9		
		Dvst	38.5	5.49	10.3	4.27	27.4	1.63	15.1	11.8	19.6	19.5	17.4	11	15.6	8.5	19.5	19.6	24.5	17.4	13.7	11.4		
		Max	168	24.5	42.5	13.2	120	4.82	65.9	54.4	28.5	-8.4	5.28	43.3	-5.5	37.5	11.8	78.4	108	61	-11	54		
		Min	7.22	-6.8	-2.2	-8.1	6.19	-3.1	9.17	2.5	-66	-86	-62	-21	-61	-5.3	-65	-11	-2.8	-1.9	-69	8.12		
hBD3		Global	Prom	164	1.57	5.52	1.18	181	0.2	164	146	-152	-146	-157	-0.7	-160	3.25	-152	7.81	0.81	164	-157	149	
			Dvst	39.3	6.87	18.5	6.31	41.2	6.93	20	13.9	34.9	18.3	21.9	16.6	17.1	12.7	25.5	28.1	8.77	19	28.4	14.4	
			Max	256	31.9	96.2	28.7	294	50	209	203	94.4	-111	-113	99.1	-122	61.3	-53	135	60.9	212	-117	176	
			Min	98.5	-7.4	-3.8	-7.3	111	-5.5	122	112	-186	-189	-203	-23	-192	-13	-191	-18	-5.7	111	-214	119	
	Local	Prom	168	-1.1	5.65	7.08	159	19.9	157	146	-133	-145	-147	-0.7	-131	-3.2	-136	3.4	8.68	161	-159	152		
		Dvst	51.3	5.84	19.7	37.5	29.6	56.9	27.3	16.8	62.9	32.4	40.1	7.83	47.9	6.16	35.5	20.3	31.6	28.2	37.3	22		
		Max	287	28.7	165	320	255	349	258	176	190	-32	71.5	34.3	111	16.4	-26	125	251	253	-55	192		
		Min	72.3	-8.3	-4.4	-7.2	92.6	-8.1	107	109	-216	-217	-215	-20	-180	-28	-193	-19	-6.2	93.7	-221	112		
	Residuos CCR2		E105	K114	K180	K183	E184	D185	R196	R206	E270	E278	D284											
	CCL2	Global	Prom	-71	62.7	80.2	89.6	-81	-88	95.5	69.2	-82	-82	-85										
			Dvst	13	10.6	12.5	26.8	12.2	14	37.7	11.6	17.5	13.8	9.61										
			Max	-43	83.7	112	175	-63	-51	209	99.3	-52	-51	-28										
Min			-106	45.4	60.5	54.9	-113	-117	53.7	50.5	-117	-113	-104											
Local		Prom	-63	65.7	81.9	83.4	-82	-87	103	72	-89	-83	-85											
		Dvst	23.4	11.7	13.4	27.8	14.7	12.6	34.5	9.97	16.4	16.8	6.53											
		Max	50	95.5	108	186	-59	-70	209	87.5	-51	-47	-73											
		Min	-90	48.5	61.7	55.6	-113	-121	55.1	57	-114	-121	-104											
hBD6		Global	Prom	-30	32.2	41.3	48.6	-41	-44	56.4	35	-39	-40	-43										
			Dvst	14.2	12.5	18.6	30.5	20.7	18.9	32.1	9.73	12.8	18.1	12.7										
			Max	-3.2	67.8	84.5	128	29.6	-5.1	122	56.8	-8.4	34.2	-2.5										
			Min	-82	5.3	0.73	-3.3	-80	-79	12.5	8.26	-66	-79	-73										
	Local	Prom	-31	32.7	36.3	35	-36	-39	53.3	32.8	-37	-37	-37											
		Dvst	11.9	14.2	17.4	14.3	21.5	15.6	32.6	9.28	13.8	20.2	12.7											
		Max	-14	67.8	70.2	64.4	29.6	-5.1	112	52	-8.4	-3.6	-2.5											
		Min	-60	5.3	1.97	3.52	-75	-71	15.5	11.3	-57	-79	-58											
	hBD3	Global	Prom	-138	116	151	162	-154	-163	167	125	-143	-155	-153										
			Dvst	28.1	20.3	24.8	36.8	22	16.3	63	20.6	31.4	25.2	12.6										
			Max	-98	188	194	262	-102	-131	305	188	-84	-90	-122										
			Min	-220	82.8	107	109	-191	-191	90.4	94.8	-194	-203	-183										
Local		Prom	-137	112	135	159	-136	-136	134	121	-130	-142	-148											
		Dvst	38.9	25.1	20.8	41.1	24.8	41.5	32.9	15.5	43	31.4	23.7											
		Max	40.4	209	196	257	-83	-11	217	154	153	-75	-66											
		Min	-214	77.3	83.1	85.4	-193	-193	83.3	92.7	-192	-225	-191											
hBD3M		Global	Prom	168	-1.1	5.65	7.08	159	19.9	157	146	-133	-145	-147	-0.7	-131	-3.2	-136	3.4	8.68	161	-159	152	
			Dvst	51.3	5.84	19.7	37.5	29.6	56.9	27.3	16.8	62.9	32.4	40.1	7.83	47.9	6.16	35.5	20.3	31.6	28.2	37.3	22	
			Max	287	28.7	165	320	255	349	258	176	190	-32	71.5	34.3	111	16.4	-26	125	251	253	-55	192	
			Min	72.3	-8.3	-4.4	-7.2	92.6	-8.1	107	109	-216	-217	-215	-20	-180	-28	-193	-19	-6.2	93.7	-221	112	

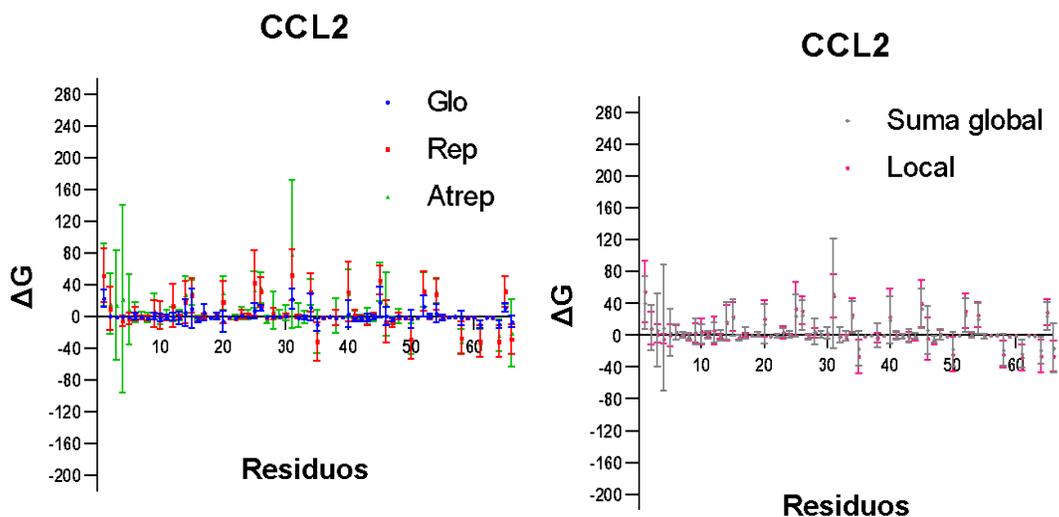


Figura 21. Aportaciones energéticas de CCL2 al complejo CCR2xCCL2. Se muestran los valores promedio, máximos y mínimos de energía libre de cada residuo.

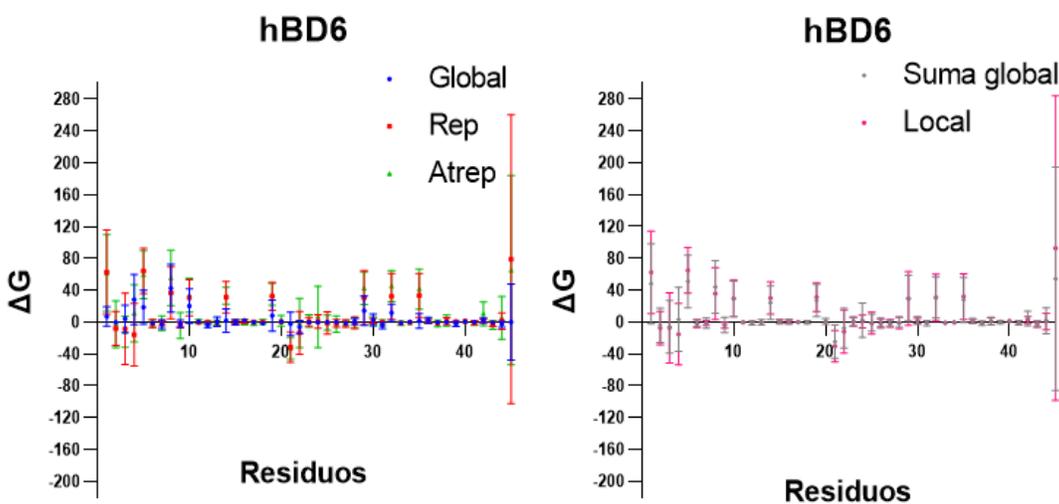


Figura 22. Aportaciones energéticas de hBD6 al complejo CCR2xhBD6. Se muestran los valores promedio, máximos y mínimos de energía libre de cada residuo.

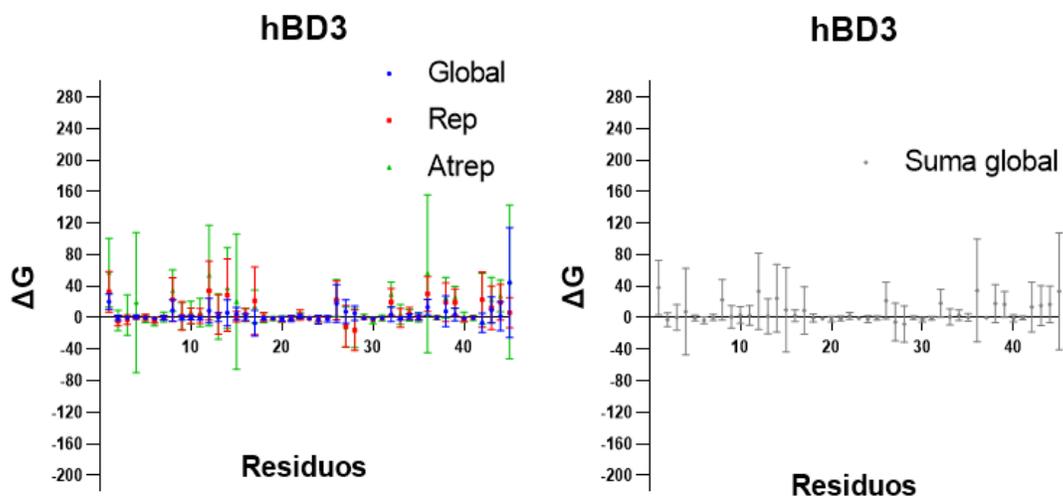


Figura 23. Aportaciones energéticas de hBD3 al complejo CCR2xhBD3. Se muestran los valores promedio, máximos y mínimos de energía libre de cada residuo.

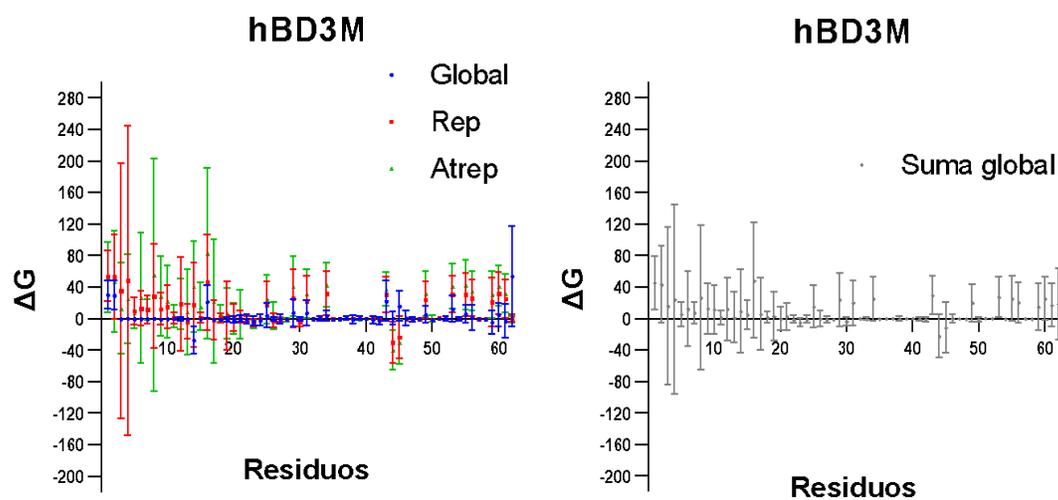


Figura 24. Aportaciones energéticas de hBD3M al complejo CCR2xhBD3M. Se muestran los valores promedio, máximos y mínimos de energía libre de cada residuo.

Tabla 8. Residuos de los ligandos con mayor contribución energética a los complejos.

Residuos		I1	N2	A3	P4	V5	T6	Y9	N10	T12	R14	K15	R20	S23	R25	R26	T28
Prom		40.7	9.29	6.68	9.22	3.79	3.54	4.54	1.94	3.47	17.5	21.9	14.1	3.18	24.7	25.2	4.35
Dvst		33.1	28.1	46.1	11.9	29.8	9.54	16.3	12.1	12.9	23.6	22.6	25.1	5.47	26.4	19	16.3
Max		136	187	373	641	217	47.8	73.6	65.9	87.6	71.5	87.6	64.3	32.4	108	97.5	130
Min		-4	-14	-12	-16	-20	-13	-15	-17	-10	-30	-29	-36	-2.5	-18	3.33	-2.1
Prom		55.1	8.68	1.68	-4.9	0.12	3.65	2.42	4.29	6.38	16.2	23.6	20.8	3.54	33.3	30.6	2.98
Dvst		38.4	20.1	11.3	5.78	13.3	8.58	12.1	15.9	17.5	22.2	17.6	22.8	7.58	33.3	17.4	6.17
Max		138	87.1	57.4	4.9	53.5	25.3	50.1	60.4	87.6	68.3	61.6	85.8	37.4	108	58.1	24.7
Min		0.11	-5.2	-16	-16	-15	-11	-15	-9.1	-7.6	-23	-8.2	-21	-3.3	-18	4.14	-1.5
Residuos		K31	K34	E35	I38	K40	K45	E46	I47	D50	K52	K54	D58	D61	D64	K65	Q66
Prom		39.3	23.3	-17	-0.1	19.1	33.6	6.74	-4.6	-18	25.4	20.5	-18	-23	-19	24.4	-16
Dvst		24.6	19.8	22	15.2	29.5	24.9	30.3	4.1	21.4	21.4	19.3	19.4	18.1	17.3	17.4	30.6
Max		117	61.2	65	116	97.1	107	143	3.78	23	78.6	71.4	19	-2.6	26.5	86	145
Min		3	-18	-60	-8.9	-20	-17	-62	-19	-65	-16	-15	-69	-86	-69	3.6	-73
Prom		49.5	25.9	-27	-3	23.6	39.6	-4.1	-6.4	-24	30.7	25.8	-24	-28	-26	28.8	-26
Dvst		26.5	21.1	20.8	5.99	34.1	29.3	26.4	5.05	21.2	21.8	15.9	16.7	16.3	20.3	16	19.5
Max		117	61.2	3.9	27.5	97.1	122	45	3.47	6.74	70.2	56.5	4.42	-2.8	14.7	77.1	2.54
Min		10.1	-9.6	-63	-10	-31	-34	-62	-19	-60	-6.3	0.14	-60	-76	-69	6.15	-69
Residuos		F1	F2	D3	E4	K5	K8	K10	K14	K19	E21	E22	K29	K32	R35	I44	D45
Prom		47.9	-4.4	-6.4	3.48	51.2	43.9	28.9	24.2	26.8	-25	-7.8	30.2	30.9	27.8	1.36	23.8
Dvst		49.8	21.3	32.8	40.1	32.9	33	22.1	20.7	19.9	20.8	24.9	28.4	25.5	28	16.2	66
Max		231	84.3	84.8	95.6	149	146	72.9	66.7	65.2	18.3	46.1	81.7	99	100	92.6	206
Min		-13	-40	-82	-83	-13	-14	-12	-27	-24	-66	-64	-34	-15	-14	-22	-118
Prom		62.5	-7.7	-7.4	-15	65.1	35.4	29.6	30	31.2	-30	-12	29.5	30.7	32	0.61	25.7
Dvst		51.1	20.6	43.4	38	28	32.3	22.6	19.9	17.7	19.4	26.7	33.4	29	28	10.1	69
Max		231	78.1	84.8	95.6	126	97.3	72.9	66.7	62.4	-2.4	36.1	81.7	83.5	80	32.9	145
Min		-13	-28	-82	-83	5.49	-14	-12	2.18	5.69	-66	-61	-34	-15	-11	-22	-114
Residuos		G1	I2	I3	K8	Y9	Y10	C11	R12	V13	R14	R17	K26	E27	E28	K32	C33
Prom		38.1	-2.6	0.52	22.8	1.18	3.17	2.97	33.5	1.84	24.7	9.3	21.8	-5.3	-8.2	18.5	1.1
Dvst		34.3	8.9	16.2	25.4	14.3	10.8	12.5	48.2	22.2	42.7	30	23.6	24	23	17.8	10.2
Max		161	30.5	86.8	88.6	63.1	54.4	66	339	135	186	153	67.4	48.8	64.8	55.5	45.2
Min		0.01	-30	-22	-15	-17	-14	-10	-10	-15	-22	-48	-18	-63	-54	-19	-11
Residuos		R36	R38	K39	R42	R43	K44	K45									
Prom		26.9	18.1	16.9	13.7	15.3	16.9	22.2									
Dvst		20.3	24.3	16	31.4	25.3	22.9	33.4									
Max		68.5	63.5	47.1	141	70.2	65.3	159									
Min		-13	-31	-20	-28	-33	-21	-20									
Residuos		M1	R2	G3	S4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	G11	S12	I13	E14	G15	R16
Prom		45.4	43.4	-0.9	7.6	5.93	12.6	7.33	26.8	12.7	11.8	1.59	12.1	1.56	9.1	5.2	39.6
Dvst		34.2	48.9	5.57	14.2	15.3	47.6	13.9	90.9	31.8	30.9	8.97	39.7	32.3	53.1	18.2	44.7
Max		162	299	30.8	88.1	97.4	394	70.4	731	240	239	56.8	325	251	172	94.5	322
Min		-40	-22	-15	-6.9	-11	-8.3	-11	-9.3	-15	-7.9	-13	-13	-37	-80	-16	-18
Residuos		M17	G18	I19	I20	N21	T22	L23	Q24	K25	Y26	Y27	R29	R31	R34	K43	E44
Prom		5.9	2.01	11.7	0.12	2.54	-0.8	-5.1	-0.9	15.3	0.15	-1.2	24.1	20.2	25.5	29.9	-22
Dvst		46.1	7.45	84.3	14.7	17.5	5.15	5.4	4.72	26.9	10.8	4.52	34	28.6	27.7	24.1	26.9
Max		319	36.4	737	92.2	145	23.2	18.2	25.3	84.6	52.4	28.9	114	105	114	92.5	14.7
Min		-27	-7	-19	-14	-22	-15	-22	-23	-24	-14	-12	-28	-26	-8.3	-25	-104
Residuos		E45	K49	R53	R55	K56	R59	R60	K61	K62							
Prom		-11	20	27.6	25.9	20.4	15.1	25.5	17.4	18.9							
Dvst		32	24.1	25.7	28.6	25.4	29.5	27.4	27.6	45.2							
Max		64.7	82.2	110	106	89.8	92.9	108	86.8	186							
Min		-91	-32	-39	-25	-29	-31	-26	-34	-20							

Se puede observar que las aportaciones energéticas a los complejos por parte de los ligandos son más variadas que aquellas que aporta el receptor, ya que en CCR2 los residuos positivos y negativos aportan energía conforme a su carga en todos los complejos generados, mientras que en los ligandos estos residuos aportaban energía positiva o negativa, lo cual se podría deber a la posición del ligando sobre el receptor. Cabe mencionar que en *ClusPro* el receptor permanece inmóvil y el ligando flexible durante el acoplamiento. A pesar de esto, la aportación energética promedio de estos residuos concuerda con su carga.

7.5 Reacoplamiento

HADDOCK clasifica los complejos obtenidos en conjuntos y los ordena para saber cuáles son los más favorables a la unión receptor-ligando. Para un mejor entendimiento se escogieron los mejores cinco conjuntos de cada acoplamiento y sus calificaciones se presentan en las Tabla 10 y 11. De estos conjuntos se escogieron aquellos con un valor-Z negativo, el cual indica a cuantas desviaciones estándar el conjunto está en el promedio.

Se realizaron dos reacoplamientos, uno con los residuos de las Tablas 7 y 8 marcados como activos y otro solo con los residuos catiónicos de los ligandos marcados como activos en *HADDOCK*. En la Tabla 9 se muestran los residuos tal cual se utilizaron en *HADDOCK*, los ligandos con (1) indican que se usaron los residuos con aportación energética, como se presentaron anteriormente, y los marcados con (2) indican que solo se marcaron como activos los residuos cargados, los cuales son los que mayor aportan a la unión, además del N-terminal, el cual también se observó, aporta a la unión, en el caso de HBD3M (2) solo se usaron residuos presentes en el péptido original. *HADDOCK* ordena los complejos de acuerdo con su RMSD y los acomoda en conjuntos, los cuales son ordenados por sus características, además de esto, cada conjunto tiene una calificación *HADDOCK* y un valor-Z. Entonces, de los conjuntos obtenidos se escogieron aquellos con valor-Z negativos y se utilizó el mejor complejo de cada conjunto, esto es, aquellos que presentaron menor energía según *HADDOCK*. También se tomó en cuenta la calificación *HADDOCK*, así como las energías individuales presentadas

por el servidor. De igual forma, se consideró que los residuos D25, Y26, D27 y Y28 tuvieran contacto con los ligandos, para lo cual se generaron mapas y tablas de contacto con el servidor *CoCoMaps*. Finalmente, para seleccionar los modelos finales de cada complejo, se obtuvo la energía de unión de los complejos seleccionados con el servidor *FiberDock*. En la Tabla 10 y 11 se muestran los resultados del acoplamiento 1 y 2, respectivamente, y en la Tabla 12 se muestran las energías según *HADDOCK*, así como los números de contactos con la región DYDY del receptor.

Tabla 9. Residuos utilizados como activos y pasivos en el reacoplamiento con HADDOCK.

Activos	
CCR2	1, 6, 8, 11, 15, 18, 19, 25, 27, 34, 36, 38, 105, 114, 180, 183, 184, 185, 196, 206, 270, 278, 284
CCL2 (1)	5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 18, 19, 24, 29, 30, 35, 38, 39, 42, 44, 49, 50, 54, 56, 58, 62, 65, 68, 69, 70
CCL2 (2)	5, 6, 7, 8, 18, 19, 24, 29, 30, 35, 38, 39, 44, 49, 50, 54, 56, 58, 62, 65, 68, 69, 70
hBD6 (1)	1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 14, 19, 21, 22, 29, 32, 35, 44, 45
hBD6 (2)	1, 3, 4, 5, 8, 10, 14, 19, 21, 22, 29, 32, 35, 45
hBD3 (1)	1, 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 26, 27, 28, 32, 33, 36, 38, 39, 42, 43, 44, 45
hBD3 (2)	1, 2, 3, 4, 8, 12, 14, 17, 26, 27, 28, 32, 36, 38, 39, 42, 43, 44, 45
hBD3M (1)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 26, 27, 29, 31, 34, 43, 44, 45, 49, 50, 53, 55, 56, 59, 60, 61, 62
hBD3M (2)	18, 19, 20, 21, 22, 25, 29, 31, 34, 43, 44, 45, 49, 56, 59, 60, 61, 62
Pasivos	
CCR2	2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 37, 39, 40, 41, 42, 101, 102, 103, 104, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 181, 182, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 269, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 279, 280, 281, 282, 283, 285

Tabla 10. Resultados de reacoplamiento 1 con HADDOCK.

	CCL2	hBD6	hBD3	hBD3M
	Conjunto 1	Conjunto 1	Conjunto 3	Conjunto 2
Calificación HADDOCK	-79.5 +/- 7.2	-89.1 +/- 4.9	-59.1 +/- 23.2	-104.1 +/- 11.8
Tamaño del Conjunto	15	21	4	7
RMSD contra la estructura de menor energía	1.0 +/- 0.6	2.7 +/- 0.2	1.4 +/- 0.9	3.3 +/- 0.6
Energía de van der Waals	-73.5 +/- 5.1	-41.1 +/- 3.2	-49.2 +/- 8.5	-60.4 +/- 9.8
Energía electrostática	-184.9 +/- 42.9	-258.8 +/- 64.2	-149.1 +/- 19.9	-315.3 +/- 35.6
Energía de desolvatación	-19.6 +/- 4.7	-30.1 +/- 3.5	-31.4 +/- 5.7	-32.0 +/- 5.8
Energía de violación de restricciones	505.2 +/- 32.38	338.9 +/- 75.88	513.4 +/- 131.36	513.2 +/- 59.83
Superficie enterrada	2280.6 +/- 147.4	1650.2 +/- 101.0	1689.1 +/- 171.1	2367.9 +/- 181.0
Valor-Z	-1.5	-1.4	-1.1	-1.5
	Conjunto 3	Conjunto 9	Conjunto 1	Conjunto 3
Calificación HADDOCK	-66.0 +/- 11.3	-88.2 +/- 5.1	-56.5 +/- 4.7	-88.4 +/- 14.9
Tamaño del Conjunto	8	5	5	7
RMSD contra la estructura de menor energía	12.5 +/- 0.1	4.0 +/- 0.0	10.9 +/- 0.3	14.8 +/- 0.1
Energía de van der Waals	-47.8 +/- 4.4	-45.5 +/- 4.1	-49.5 +/- 6.7	-65.1 +/- 5.2
Energía electrostática	-351.1 +/- 47.0	-248.1 +/- 25.4	-196.3 +/- 19.0	-230.3 +/- 29.0
Energía de desolvatación	0.8 +/- 3.2	-30.2 +/- 3.7	-0.4 +/- 3.0	-36.2 +/- 3.9
Energía de violación de restricciones	511.9 +/- 57.72	371.2 +/- 35.27	327.5 +/- 59.18	589.1 +/- 79.85
Superficie enterrada	1911.8 +/- 110.6	1842.5 +/- 84.8	1665.3 +/- 81.2	2302.6 +/- 138.5
Valor-Z	-0.8	-1.3	-0.9	-0.8
	Conjunto 6	Conjunto 3	Conjunto 5	Conjunto 1
Calificación HADDOCK	-61.2 +/- 6.3	-82.9 +/- 7.7	-51.7 +/- 10.3	-77.9 +/- 8.0
Tamaño del Conjunto	5	10	4	9
RMSD contra la estructura de menor energía	7.6 +/- 0.3	9.5 +/- 0.4	10.8 +/- 0.3	15.0 +/- 0.1
Energía de van der Waals	-54.5 +/- 6.0	-43.9 +/- 7.4	-33.4 +/- 7.9	-52.5 +/- 6.6
Energía electrostática	-131.9 +/- 19.8	-304.4 +/- 46.3	-341.1 +/- 15.2	-225.4 +/- 20.9
Energía de desolvatación	-31.3 +/- 2.9	-14.3 +/- 3.3	8.1 +/- 1.8	-47.2 +/- 2.4
Energía de violación de restricciones	510.1 +/- 63.71	361.9 +/- 33.09	418.7 +/- 72.14	669.4 +/- 62.61
Superficie enterrada	1722.8 +/- 131.7	1865.8 +/- 81.1	1621.8 +/- 120.4	2408.2 +/- 59.0
Valor-Z	-0.5	-0.8	-0.4	-0.4
	Conjunto 5	Conjunto 2	Conjunto 4	Conjunto 6
Calificación HADDOCK	-49.5 +/- 13.2	-80.5 +/- 10.8	-38.7 +/- 16.6	-57.8 +/- 19.9
Tamaño del Conjunto	5	11	4	4
RMSD contra la estructura de menor energía	3.6 +/- 0.2	2.3 +/- 0.6	6.1 +/- 0.2	13.6 +/- 0.1
Energía de van der Waals	-57.5 +/- 6.5	-31.5 +/- 3.4	-48.6 +/- 6.5	-52.2 +/- 8.9
Energía electrostática	-136.2 +/- 18.0	-270.8 +/- 81.9	-72.2 +/- 13.4	-205.7 +/- 39.2
Energía de desolvatación	-25.5 +/- 5.2	-25.6 +/- 3.5	-22.6 +/- 6.3	-18.9 +/- 7.1
Energía de violación de restricciones	608.0 +/- 107.37	308.0 +/- 59.66	468.5 +/- 57.94	544.6 +/- 35.94
Superficie enterrada	1903.8 +/- 151.7	1419.0 +/- 120.7	1587.3 +/- 89.2	2005.0 +/- 153.9
Valor-Z	0.1	-0.5	1	0.4
	Conjunto 2	Conjunto 6	Conjunto 2	Conjunto 5
Calificación HADDOCK	-48.9 +/- 3.6	-80.0 +/- 6.1	-35.1 +/- 10.8	-42.0 +/- 14.4
Tamaño del Conjunto	9	6	4	4
RMSD contra la estructura de menor energía	11.1 +/- 0.1	9.5 +/- 0.1	6.0 +/- 0.1	11.0 +/- 0.5
Energía de van der Waals	-61.2 +/- 4.4	-43.7 +/- 4.0	-32.4 +/- 6.9	-48.6 +/- 12.7
Energía electrostática	-219.4 +/- 27.2	-295.9 +/- 38.2	-167.0 +/- 14.7	-189.7 +/- 21.1
Energía de desolvatación	-7.9 +/- 2.3	-13.7 +/- 4.6	-6.7 +/- 4.2	-31.4 +/- 2.1
Energía de violación de restricciones	641.3 +/- 50.84	365.4 +/- 124.76	373.5 +/- 66.50	760.3 +/- 47.68
Superficie enterrada	1958.9 +/- 18.6	1612.7 +/- 147.4	1556.6 +/- 144.5	1974.0 +/- 136.4
Valor-Z	0.2	-0.5	1.4	1.1
	Conjunto 4	Conjunto 4		Conjunto 4
Calificación HADDOCK	-37.2 +/- 8.0	-71.1 +/- 4.6		-37.3 +/- 15.1
Tamaño del Conjunto	6	8		6
RMSD contra la estructura de menor energía	7.7 +/- 0.7	3.8 +/- 0.2		12.3 +/- 0.3
Energía de van der Waals	-50.0 +/- 5.1	-34.1 +/- 7.6		-49.5 +/- 6.3
Energía electrostática	-167.2 +/- 49.5	-266.5 +/- 35.6		-101.2 +/- 13.9
Energía de desolvatación	-13.2 +/- 4.4	-23.6 +/- 4.6		-29.7 +/- 3.7
Energía de violación de restricciones	594.3 +/- 85.63	399.2 +/- 59.49		621.9 +/- 104.96
Superficie enterrada	1721.7 +/- 72.9	1429.0 +/- 91.7		1639.8 +/- 51.0
Valor-Z	0.8	0.4		1.3

Tabla 11. Resultados de reacoplamiento 2 con HADDOCK.

	CCL2	hBD6	hBD3	hBD3M
	Conjunto 8	Conjunto 1	Conjunto 4	Conjunto 1
Calificación HADDOCK	-78.5 +/- 11.9	-95.2 +/- 5.2	-64.4 +/- 12.2	-71.6 +/- 3.8
Tamaño del conjunto	5	20	8	27
RMSD contra estructura de menor energía	7.8 +/- 0.3	6.5 +/- 0.1	6.3 +/- 0.1	16.3 +/- 0.2
Energía de van der Waals	-58.5 +/- 3.3	-42.7 +/- 5.9	-45.0 +/- 2.2	-56.2 +/- 9.6
Energía electrostática	-206.4 +/- 30.1	-291.4 +/- 41.6	-218.1 +/- 18.0	-194.0 +/- 44.3
Energía de desolvatación	-24.7 +/- 4.6	-24.3 +/- 4.8	-5.6 +/- 5.3	-12.3 +/- 9.4
Energía de violación de restricciones	460.1 +/- 118.7	301.6 +/- 62.0	297.6 +/- 42.4	356.1 +/- 76.9
Superficie enterrada	1872.0 +/- 78.8	1622.6 +/- 65.2	1524.5 +/- 56.1	1943.8 +/- 251.3
Valor-Z	-2.3	-1.7	-1.2	-1.4
	Conjunto 5	Conjunto 3	Conjunto 8	Conjunto 10
Calificación HADDOCK	-57.6 +/- 5.3	-85.3 +/- 4.7	-60.5 +/- 3.5	-68.0 +/- 16.4
Tamaño del conjunto	6	7	4	4
RMSD contra estructura de menor energía	9.1 +/- 0.1	9.5 +/- 0.1	8.3 +/- 0.3	17.4 +/- 0.3
Energía de van der Waals	-59.0 +/- 5.4	-42.1 +/- 6.2	-51.5 +/- 3.4	-51.2 +/- 8.3
Energía electrostática	-161.0 +/- 18.9	-320.6 +/- 29.1	-158.9 +/- 32.5	-242.0 +/- 17.0
Energía de desolvatación	-23.2 +/- 8.5	-14.4 +/- 1.7	-11.1 +/- 2.2	1.2 +/- 5.8
Energía de violación de restricciones	567.8 +/- 42.5	353.1 +/- 41.5	337.6 +/- 106.0	304.5 +/- 18.6
Superficie enterrada	1883.2 +/- 98.0	1686.7 +/- 65.8	1807.8 +/- 136.5	1796.8 +/- 147.1
Valor-Z	-0.6	-1	-0.7	-1.1
	Conjunto 4	Conjunto 4	Conjunto 5	Conjunto 4
Calificación HADDOCK	-56.4 +/- 7.2	-83.4 +/- 4.4	-58.7 +/- 12.9	-63.0 +/- 4.5
Tamaño del conjunto	6	7	6	7
RMSD contra estructura de menor energía	3.9 +/- 0.7	10.8 +/- 0.3	9.0 +/- 0.2	15.2 +/- 0.2
Energía de van der Waals	-63.5 +/- 3.8	-52.1 +/- 9.3	-54.2 +/- 8.3	-57.4 +/- 6.5
Energía electrostática	-116.6 +/- 36.8	-269.8 +/- 53.6	-112.8 +/- 19.3	-121.6 +/- 16.6
Energía de desolvatación	-16.1 +/- 3.1	-18.3 +/- 3.5	-22.1 +/- 6.6	-23.1 +/- 3.6
Energía de violación de restricciones	465.6 +/- 19.9	410.0 +/- 46.9	402.3 +/- 53.5	417.3 +/- 47.0
Superficie enterrada	1855.6 +/- 73.9	1881.2 +/- 63.0	1701.0 +/- 85.7	1848.6 +/- 122.2
Valor-Z	-0.5	-0.9	-0.5	-0.7
	Conjunto 7	Conjunto 7	Conjunto 1	Conjunto 6
Calificación HADDOCK	-56.1 +/- 14.6	-81.1 +/- 14.9	-58.2 +/- 3.6	-60.2 +/- 9.3
Tamaño del conjunto	5	5	16	6
RMSD contra estructura de menor energía	8.6 +/- 0.3	1.4 +/- 0.8	7.7 +/- 0.1	11.8 +/- 0.7
Energía de van der Waals	-55.7 +/- 12.1	-39.9 +/- 7.4	-50.5 +/- 7.5	-59.6 +/- 7.5
Energía electrostática	-192.0 +/- 34.9	-203.0 +/- 11.7	-165.6 +/- 26.8	-139.9 +/- 22.0
Energía de desolvatación	-4.1 +/- 5.0	-38.8 +/- 1.8	-7.8 +/- 2.9	-10.9 +/- 4.3
Energía de violación de restricciones	420.1 +/- 58.9	381.6 +/- 67.5	331.8 +/- 102.0	383.4 +/- 93.0
Superficie enterrada	1821.8 +/- 201.0	1641.8 +/- 120.5	1636.1 +/- 82.6	1801.1 +/- 146.3
Valor-Z	-0.5	-0.7	-0.4	-0.5
	Conjunto 3	Conjunto 9	Conjunto 2	Conjunto 5
Calificación HADDOCK	-50.9 +/- 7.0	-74.2 +/- 23.8	-57.6 +/- 2.9	-57.2 +/- 6.1
Tamaño del conjunto	6	4	12	7
RMSD contra estructura de menor energía	9.9 +/- 0.1	6.4 +/- 0.1	10.1 +/- 0.2	8.3 +/- 0.2
Energía de van der Waals	-48.2 +/- 7.5	-30.1 +/- 7.5	-42.6 +/- 5.9	-42.6 +/- 6.5
Energía electrostática	-213.5 +/- 27.6	-270.8 +/- 74.3	-225.8 +/- 19.9	-281.8 +/- 48.6
Energía de desolvatación	-12.5 +/- 3.3	-26.7 +/- 5.1	-2.4 +/- 1.7	8.3 +/- 3.1
Energía de violación de restricciones	524.7 +/- 59.8	367.7 +/- 48.3	325.6 +/- 55.3	334.5 +/- 42.3
Superficie enterrada	1788.1 +/- 88.0	1390.6 +/- 129.4	1542.0 +/- 41.8	1641.6 +/- 27.4
Valor-Z	-0.1	-0.2	-0.3	-0.3
	Conjunto 10	Conjunto 8	Conjunto 7	Conjunto 9
Calificación HADDOCK	-46.6 +/- 3.5	-69.2 +/- 10.8	-55.5 +/- 6.0	-54.5 +/- 12.2
Tamaño del conjunto	4	5	5	4
RMSD contra estructura de menor energía	7.8 +/- 0.1	6.6 +/- 0.1	9.9 +/- 0.1	16.3 +/- 0.2
Energía de van der Waals	-46.1 +/- 12.0	-41.1 +/- 5.3	-53.0 +/- 6.1	-44.8 +/- 5.9
Energía electrostática	-174.4 +/- 28.4	-311.8 +/- 22.2	-89.3 +/- 21.2	-179.9 +/- 35.3
Energía de desolvatación	-11.5 +/- 5.4	-1.1 +/- 7.3	-17.5 +/- 2.6	-6.0 +/- 4.0
Energía de violación de restricciones	458.1 +/- 84.3	354.5 +/- 25.9	328.8 +/- 66.0	323.2 +/- 31.9
Superficie enterrada	1738.2 +/- 96.5	1545.5 +/- 46.4	1800.0 +/- 191.1	1565.9 +/- 114.5
Valor-Z	0.3	0.1	-0.1	-0.1

Tabla 12. Energías HADDOCK y contactos con la región DYDY del receptor. Con rojo se muestran los complejos descartados.

Reacomplamiento 1									
Ligando	Complejo	Energías (kJ/mol)				Contactos			
		vdW	Electrostática	Desolvatación	Unión	D25	Y26	D27	Y28
CCL2	1_1	-76.7569	-217.099	-18.2958	-237.11	13	11	9	13
	3_1	-53.1363	-398.117	2.16515	-372.187	0	0	0	0
	6_1	-64.0843	-165.612	-31.8212	-199.662	8	6	5	8
hBD6	1_1	-44.8427	-218.214	-33.8527	-234.518	4	2	4	9
	9_1	-48.3199	-237.658	-31.4895	-262.065	8	8	5	8
	3_1	-51.2494	-267.221	-18.0562	-275.758	0	0	0	0
	2_1	-30.3624	-349.853	-23.1853	-327.439	7	1	4	7
	6_1	-43.6932	-296.726	-9.52713	-286.44	0	0	0	0
hBD3	3_1	-56.0628	-183.46	-25.6163	-210.13	11	10	6	14
	1_1	-56.6831	-226.127	3.07388	-216.366	0	0	0	0
	5_2	-40.0034	-323.361	9.98847	-281.038	0	0	0	0
hBD3M	2_1	-63.3957	-298.194	-40.9496	-342.821	5	3	2	10
	3_1	-68.183	-240.648	-39.5672	-275.849	8	6	5	7
	1_1	-54.4757	-247.475	-45.6776	-282.203	7	6	4	4

Reacomplamiento 2									
Ligando	Complejo	Energías (kJ/mol)				Contactos			
		vdW	Electrostática	Desolvatación	Unión	D25	Y26	D27	Y28
CCL2	8_1	-61.4257	-179.231	-26.7671	-208.509	7	5	4	11
	5_1	-58.004	-132.993	-31.2624	-170.804	6	3	4	7
	4_1	-66.3662	-177.617	-10.7508	-160.889	6	3	3	2
	7_1	-68.1329	-159.096	-6.95468	-183.991	10	9	7	17
	3_1	-54.3057	-201.739	-15.8606	-215.228	7	0	7	12
hBD6	1_1	-49.1041	-250.635	-23.3862	-256.666	7	5	4	5
	3_1	-50.664	-283.809	-12.4175	-279.301	0	0	0	0
	4_1	-62.1205	-203.682	-21.6134	-222.976	0	0	0	0
	7_1	-51.3252	-211.057	-40.5077	-235.321	10	6	4	10
	9_1	-28.7561	-347.976	-31.5223	-309.327	4	1	2	10
hBD3	4_1	-48.5594	-224.302	-14.5687	-203.412	2	1	0	1
	8_1	-47.4588	-104.265	-11.548	-114.898	5	4	4	7
	5_1	-63.0355	-108.699	-27.1447	-154.392	9	7	7	17
	1_1	-55.5761	-188.153	-6.36868	-184.812	5	4	7	17
	2_1	-40.8933	-230.009	-4.07542	-215.665	0	0	0	1
	7_1	-49.1335	-77.5175	-21.8928	-96.7323	9	5	3	19
hBD3M	1_1	-70.486	-184.426	-19.1506	-207.664	12	8	6	7
	10_1	-61.7583	-262.92	0.989367	-248.982	11	3	7	17
	4_1	-65.8643	-106.829	-28.5108	-140.689	11	6	8	9
	6_1	-48.8545	-170.569	-8.1716	-170.491	6	3	6	7
	5_1	-44.0941	-261.844	4.28209	-243.657	0	0	0	0
	9_1	-44.4935	-202.134	-8.60794	-191.86	8	4	4	5

7.6 Complejos proteína-péptido del reacoplamiento con HADDOCK

Antes de presentar los complejos finales es de importancia mostrar las características electrostáticas de CCR2 y de los péptidos. Para esto se usó el plug in *APBS Electrostatics* de *PyMOL*. En la Figura 25 se muestra la distribución de cargas del receptor CCR2. Se puede observar la formación de una cavidad entre el N-ter, EC2 y EC3, la cual se mencionará como cavidad N23 de ahora en adelante. También se puede observar que tanto el interior de esta cavidad como el exterior del N-ter y EC3 presentan, principalmente, una carga negativa. Tomando en cuenta que los péptidos con los que se realizó el acoplamiento molecular son de naturaleza catiónica, se puede esperar que su sitio de unión este cerca o dentro de esta cavidad, con lo que también puede interactuar con las regiones extracelulares.

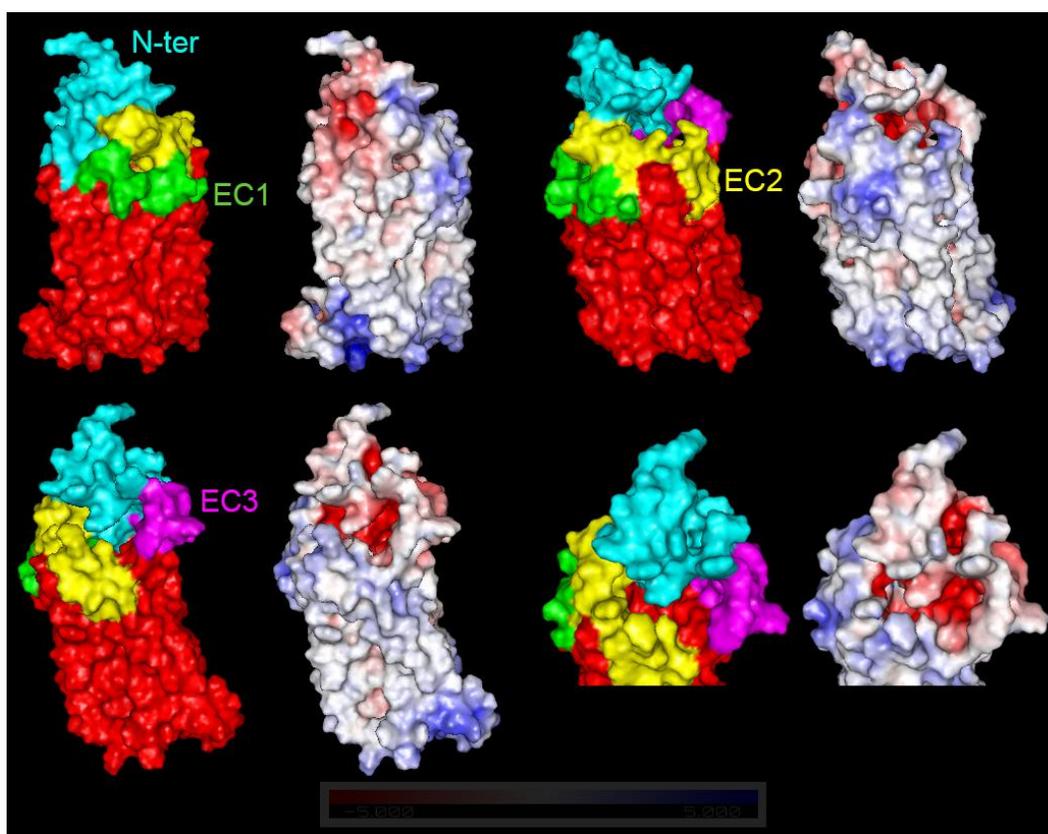


Figura 25. Características electrostáticas de CCR2. Se muestra el mapa de distribución de cargas, donde las cargas negativas se muestran en escala de rojo y las positivas en escala de azul, del receptor CCR2 junto con la representación de superficie con las regiones extracelulares marcadas de colores, cian para el N-ter, verde para EC1, amarillo para EC2 y verde para EC3.

Los ligandos se muestran en la Figura 26, se puede observar cómo tanto CCL2 como hBD6 tienen un parche con carga negativa, esto puede influir en la posición de los dos ligandos sobre el receptor. En cambio, hBD3 presenta solo un residuo con carga negativa, lo cual dificulta encontrar una orientación correcta.

Cabe recalcar que para el reacoplamiento se emplearon las aportaciones de energía libre de cada residuo, para así encontrar aquellas más representativas. Se ignoraron los contactos formados por *ClusPro* debido a la gran variedad de orientaciones encontradas para cada ligando y de la información experimental limitada para hBD3, y especialmente para hBD3M, en el cual la cola de histidinas podría modificar el modo de unión.

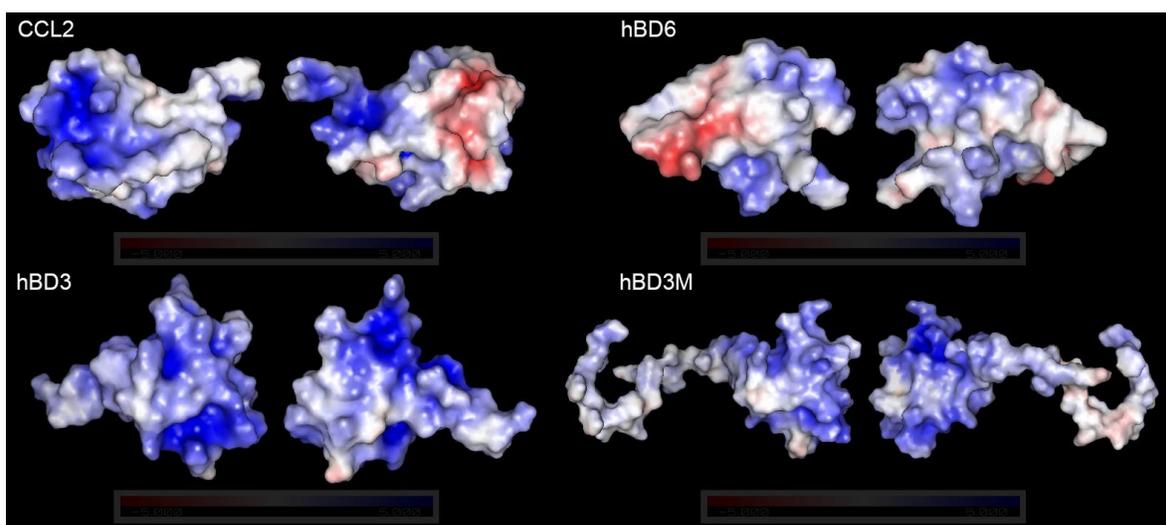


Figura 26. Características electrostáticas de los ligandos. Se muestra el mapa de distribución de cargas, donde las cargas negativas se muestran en escala de rojo y las positivas en escala de azul, de los ligandos CCL2, hBD6, hBD3 y hBD3M.

Para analizar a los complejos se obtuvieron las energías de unión, electrostáticas y de van der Waals con el servidor *FiberDock*, para así tener un mejor entendimiento de la posición de los ligandos sobre el receptor. En la Tabla 13 se muestran estas energías junto con las presentadas de la Tabla 12 y en las siguientes Figuras se muestran los ligandos sobre el receptor.

Tabla 13. Energías de los complejos según *HADDOCK* y *FiberDock*. Las abreviaciones de las energías son: Elec = electrostática, Desol = desolvatación, avdW = atracción de vdW, rvdW = repulsión de vdW, aElec = atracción electrostática de corto alcance, rElec = repulsión electrostática de corto alcance, laElec = atracción electrostática de largo alcance, y lrElec = repulsión electrostática de largo alcance. El primer reacomplamiento se indica con un (1) después del ligando, igual para el segundo con un (2).

Ligando	Complejo	Energías (kJ/mol) <i>HADDOCK</i>				Energías (kJ/mol) <i>FiberDock</i>							
		Unión	vdW	Elec	Desol	Unión	avdW	rvdW	aElec	rElec	laElec	lrElec	
CCL2 (1)	1_1	-237.11	-76.7569	-217.099	-18.2958	-54.87	-36.02	13.03	-111.7	51.77	-5.73	20.65	
	6_1	-199.662	-64.0843	-165.612	-31.8212	-20.06	-29.18	7.98	-83.22	115.59	-4.15	11.65	
CCL2 (2)	3_1	-215.228	-54.3057	-201.739	-15.8606	-55.66	-34.97	14.69	-136.86	8.57	-3.96	17.67	
	4_1	-160.889	-66.3662	-177.617	-10.7508	-26.82	-34.16	8.78	-9.67	34.43	-11.98	10.67	
	5_1	-170.804	-58.004	-132.993	-31.2624	-32.32	-29.74	15.69	-4.97	0	-3.9	8.03	
	7_1	-183.991	-68.1329	-159.096	-6.95468	-29.95	-30.22	5.85	-69.79	0	-16.23	17.58	
	8_1	-208.509	-61.4257	-179.231	-26.7671	-14.75	-29.74	11.38	-128.28	26.73	-30.36	46.93	
hBD6 (1)	1_1	-234.518	-44.8427	-218.214	-33.8527	-41.76	-21.34	3.83	-132.41	51.05	-21.2	4.7	
	2_1	-327.439	-30.3624	-349.853	-23.1853	-49.87	-18.98	4.62	-170.46	61.67	-17	7.22	
	9_1	-262.065	-48.3199	-237.658	-31.4895	-30.19	-23.47	4.31	-54.28	40.39	-8.15	12.61	
hBD6 (2)	1_1	-256.666	-49.1041	-250.635	-23.3862	-32.87	-25.89	12.84	-99.25	85.84	-23.64	5.51	
	7_1	-235.321	-51.3252	-211.057	-40.5077	-41.28	-29.37	11.95	-140.5	115.94	-37.42	35.05	
	9_1	-309.327	-28.7561	-347.976	-31.5223	-56.83	-20.93	8.32	-224.93	56.05	-11.29	4.73	
hBD3 (1)	3_1	-210.13	-56.0628	-183.46	-25.6163	-38.46	-26.99	4.94	-107.22	59.56	-22.27	20.41	
hBD3 (2)	1_1	-184.812	-55.5761	-188.153	-6.36868	-24.32	-26.66	10.73	-175.91	51.46	-27.2	31.04	
	4_1	-203.412	-48.5594	-224.302	-14.5687	-47.07	-25.7	4.81	-160.72	31.19	-28.18	6.05	
	5_1	-154.392	-63.0355	-108.699	-27.1447	-43.84	-27.89	13.15	-5.52	0	-14.55	13.76	
	7_1	-96.7323	-49.1335	-77.5175	-21.8928	-20.73	-27.47	19.21	-59.79	99.07	-11.65	40.11	
	8_1	-114.898	-47.4588	-104.265	-11.548	-18.58	-18.43	6.09	-27.12	62.34	-16.93	22	
hBD3M (1)	1_1	-282.203	-54.4757	-247.475	-45.6776	-67.72	-26.41	15.04	-103.47	0	-8.41	4.84	
	2_1	-342.821	-63.3957	-298.194	-40.9496	-46.19	-27.51	9.75	-62.24	59.33	-11.9	30.04	
	3_1	-275.849	-68.183	-240.648	-39.5672	-92.49	-35.25	11.37	-237.73	73.88	-11.34	23.89	
hBD3M (2)	1_1	-207.664	-70.486	-184.426	-19.1506	-20.98	-31.93	3.93	-43.84	63.08	-14.42	11.58	
	10_1	-248.982	-61.7583	-262.92	0.989367	-3.89	-38.31	18.49	-23.85	137.95	-11.22	26.95	
	4_1	-140.689	-65.8643	-106.829	-28.5108	-30.31	-31.79	9.78	0	10.95	-2.44	11.51	
	6_1	-170.491	-48.8545	-170.569	-8.1716	-4.06	-22.81	7.14	-103.14	65.79	-11.91	15.39	
	9_1	-191.86	-44.4935	-202.134	-8.60794	-17.42	-23.43	7.96	-81.55	39.85	-12.97	15.59	

Los complejos: CCL2 (1) 1_1, hBD6 (1) 1_1, CCL2 (2) 8_1, hBD6 (2) 1_1, hBD3 (2) 4_1 y hBD3M (2) 1_1, son los mejores según *HADDOCK*; se puede observar que los péptidos interactúan con la parte del N-ter sobre la cavidad. Previamente se ha discutido que el modo de unión de CCL2 a CCR2 podría ser primero por la interacción con el N-terminal, para que después el ligando se mueva hacia las demás regiones extracelulares (Monteclaro & Charo, 1996), por lo que estos complejos podrían representar un estadio temprano de la unión. Respecto a los demás complejos, se puede observar que a mayor cercanía a la cavidad N23 hay una mayor influencia de las interacciones (energía) de van der Waals, esto con las energías según *HADDOCK*.

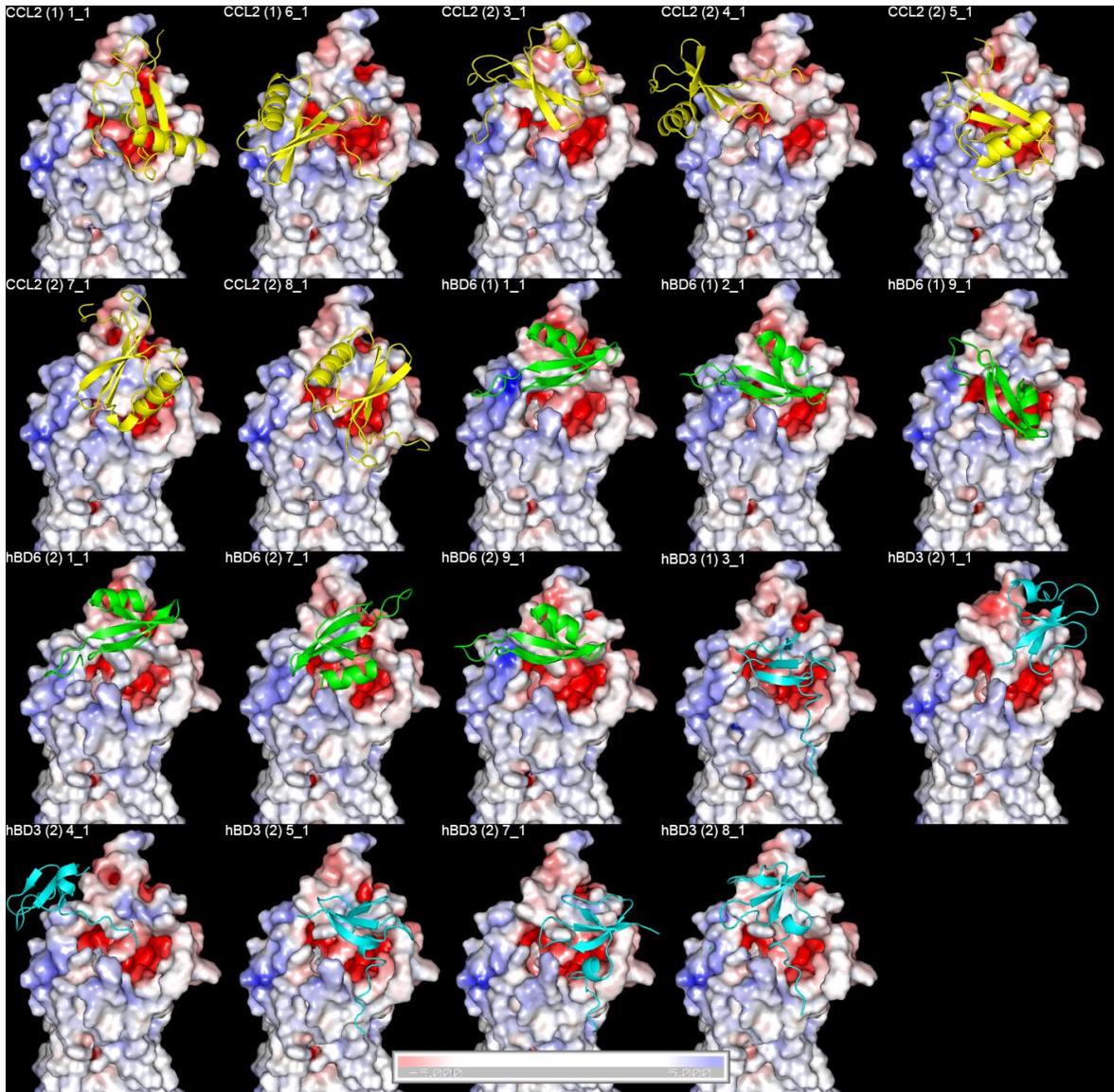


Figura 27. Ligandos sobre el receptor. Se muestran los complejos seleccionados del reacoplamiento, el ligando (amarillo para CCL2, verde para hBD6 y cian para hBD3) posa sobre el receptor, el receptor, CCR2, fue tratado con el plugin *APBS Electrostatics* para hacer visible la cavidad formada por el N-ter, EC2 y EC3.

En el primer reacoplamiento de HBD3M el mejor complejo según *HADDOCK* fue el (1) 2_1. Se muestra la parte original del péptido sobre la cavidad y la cola de histidinas rodeando al N-terminal. El complejo (1) 3_1 muestra a la cola de histidinas interactuando con la cavidad N23 y la parte original del péptido sobre el N-terminal. Se descartó al complejo (1) 1_1 debido a que el ligando interactúa con las regiones transmembranales del receptor. En el segundo reacoplamiento se observa que la parte original del péptido interactúa con la cavidad N23 y con la región del N-terminal

sobre la cavidad. En algunos complejos se observa que la cola de histidinas esta direccionada hacia las regiones transmembranales; ya que con la metodología empleada no se pudo hacer los acoplamiento con el receptor insertado en una membrana.

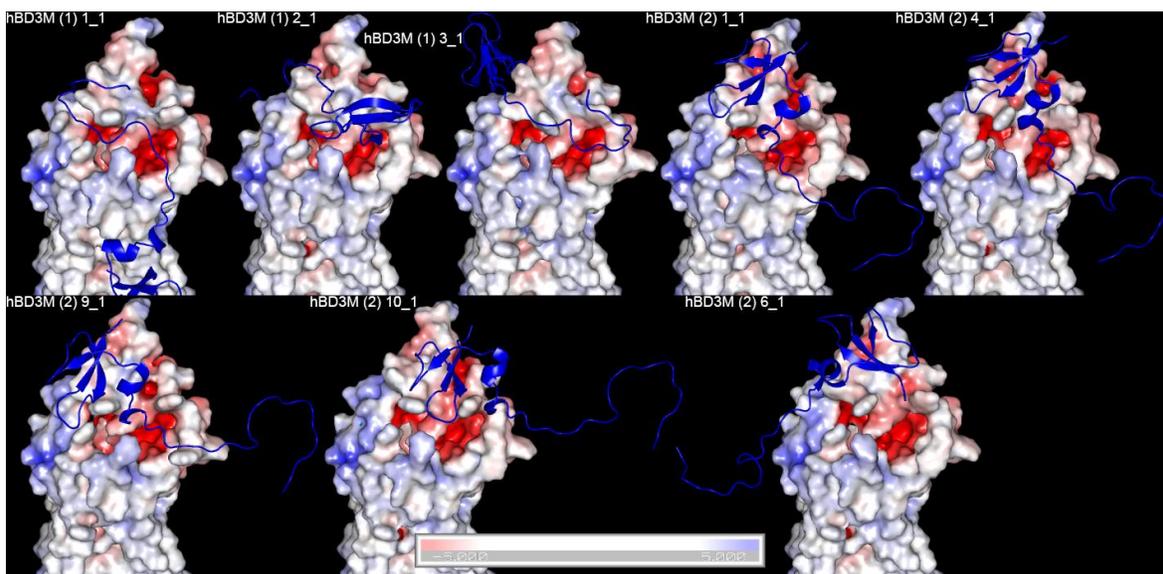


Figura 28. Ligandos sobre el receptor (cont.). Se muestran los complejos seleccionados del reacoplamiento, el ligando (azul para hBD3M) posa sobre el receptor, CCR2, el cual fue tratado con el plugin APBS *Electrostatics* para hacer visible la cavidad formada por el N-ter, EC2 y EC3.

Se escogieron los complejos en dos estados para cada ligando, en la parte superior de la cavidad y dentro de esta. Con estos complejos se generaron imágenes para determinar los contactos entre los ligandos y el receptor. En las Figuras 29 – 32 se muestran los contactos y la interfaz de los complejos. En general, se aprecia que en la cavidad N23 y en la región superior, que corresponde al N-terminal, hay una mayor tendencia a formar contactos guiados por fuerzas de van der Waals y gran parte de la interfaz de contactos (menor a 8 Å) se encuentra en el N-terminal.

En los tres péptidos se encontraron contactos en la cavidad N23, en las partes exteriores, en las regiones EC2 y EC3, y dentro de la cavidad en el N-terminal. Para las defensinas se proponen dos formas de interacción, con la cavidad N23 y con el N-terminal en la parte superior del receptor. Finalmente, para el caso de HBD3M se proponen dos modelos, uno con el péptido en una orientación similar a la de hBD3,

con la cola de histidinas rodeando el receptor, y otra donde la cola de histidinas no interactúa con el receptor; de este último solo hay interacción con el N-terminal.

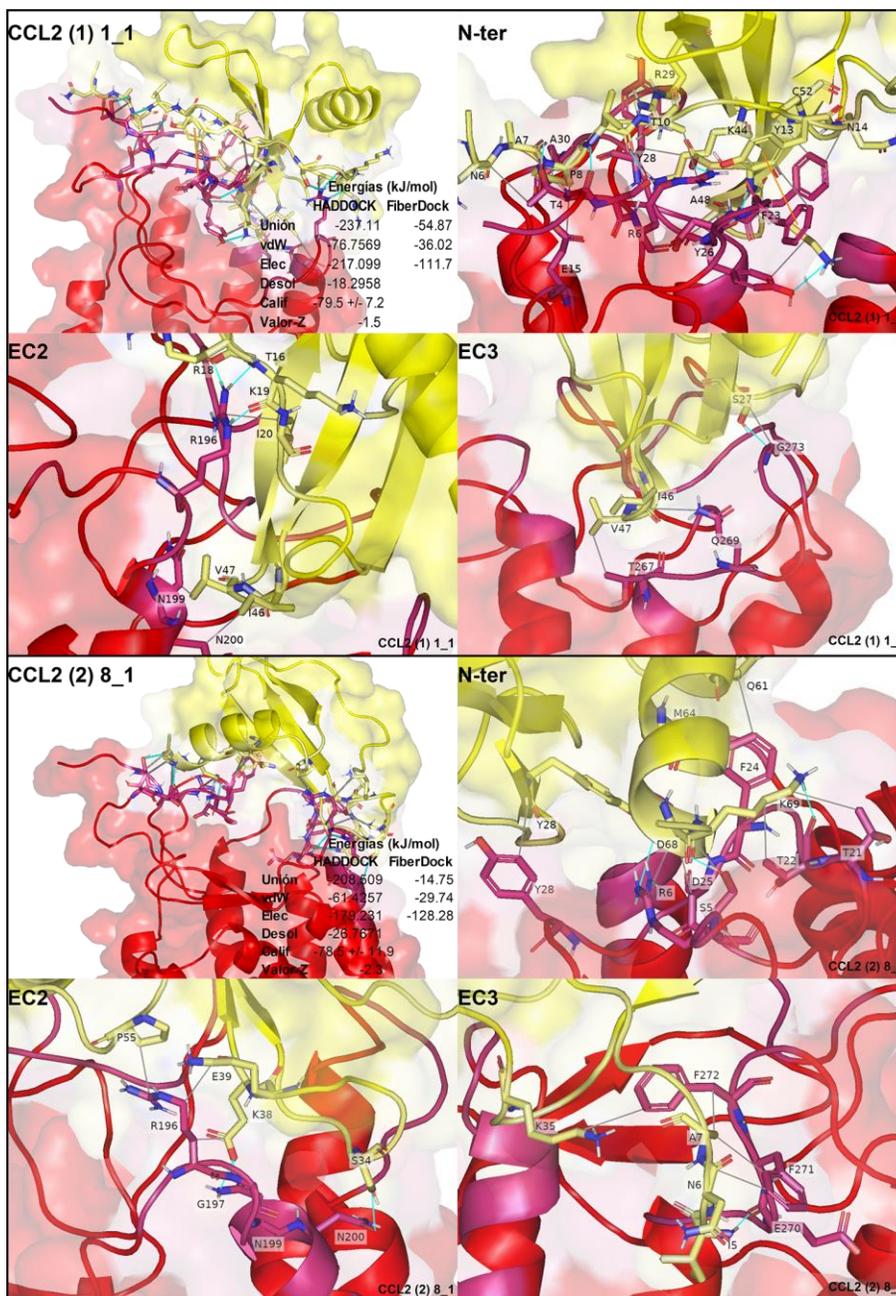


Figura 29. Contactos entre CCR2 y CCL2. En la imagen se muestran los contactos obtenidos con RING 2.0 y la interfaz de contactos obtenida con CoCoMaps, las líneas grises representan a las uniones de van der Waals, las azules a puentes hidrogeno, y las naranjas a apilamientos π - π . CCR2 se muestra de color rojo y en la región de la interfaz de color rosa cálido, CCL2 se muestra de color amarillo y la región de la interfaz de color amarillo pálido. La superficie está en 0.65 de transparencia y 0.9 en la interfaz. Colores PyMol: red, warmpink, yellow, paleyellow.

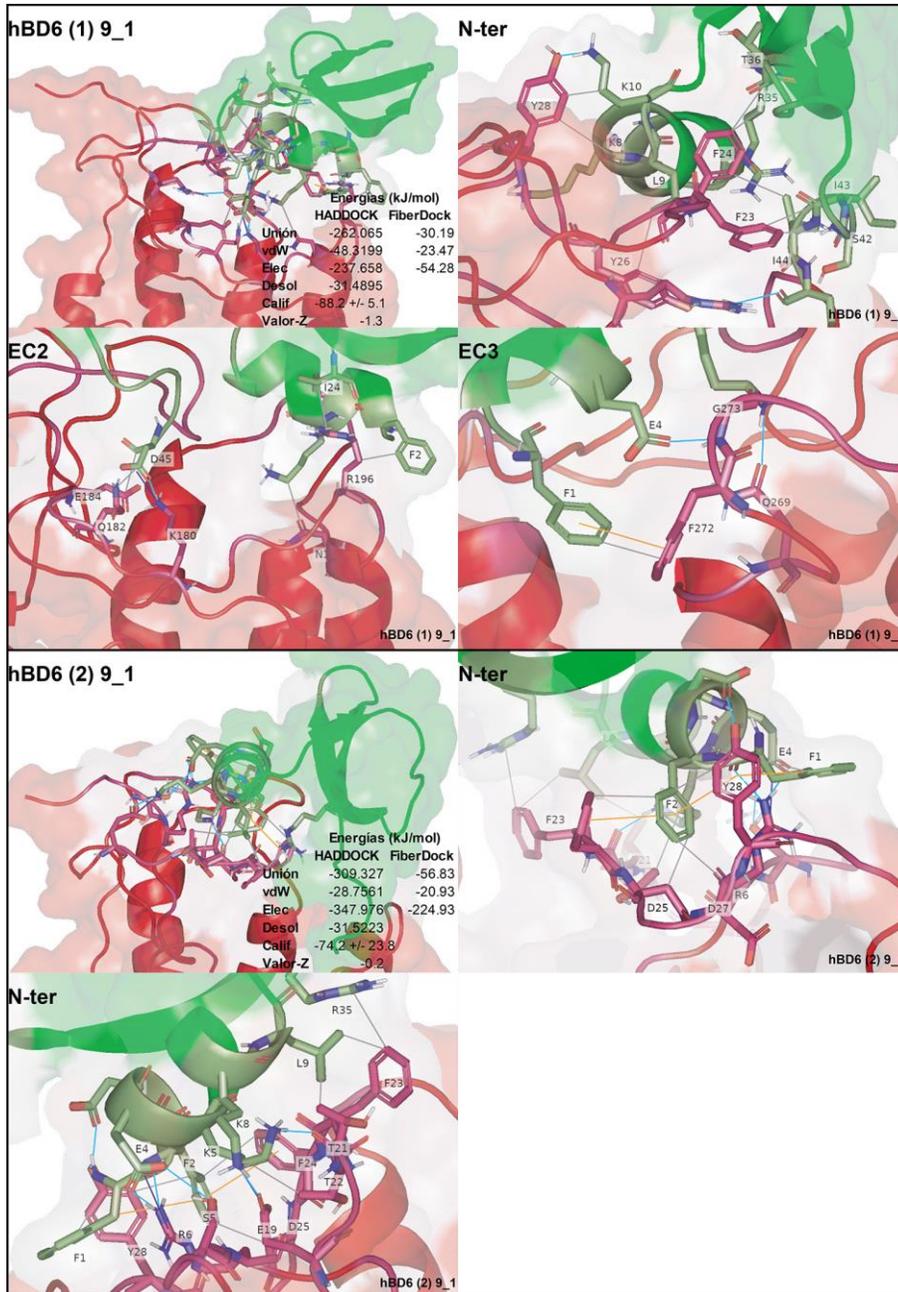


Figura 30. Contactos entre CCR2 y hBD6. En la imagen se muestran los contactos obtenidos con RING 2.0 y la interfaz de contactos obtenida con CoCoMaps, las líneas grises representan a las uniones de van der Waals, las azules a puentes hidrogeno, y las naranjas a apilamientos π - π . CCR2 se muestra de color rojo y en la región de la interfaz de color rosa cálido, hBD6 se muestra de color verde y la región de la interfaz de color verde mancha. La superficie está en 0.65 de transparencia y 0.9 en la interfaz. Colores PyMol: red, warmpink, green, smudge.

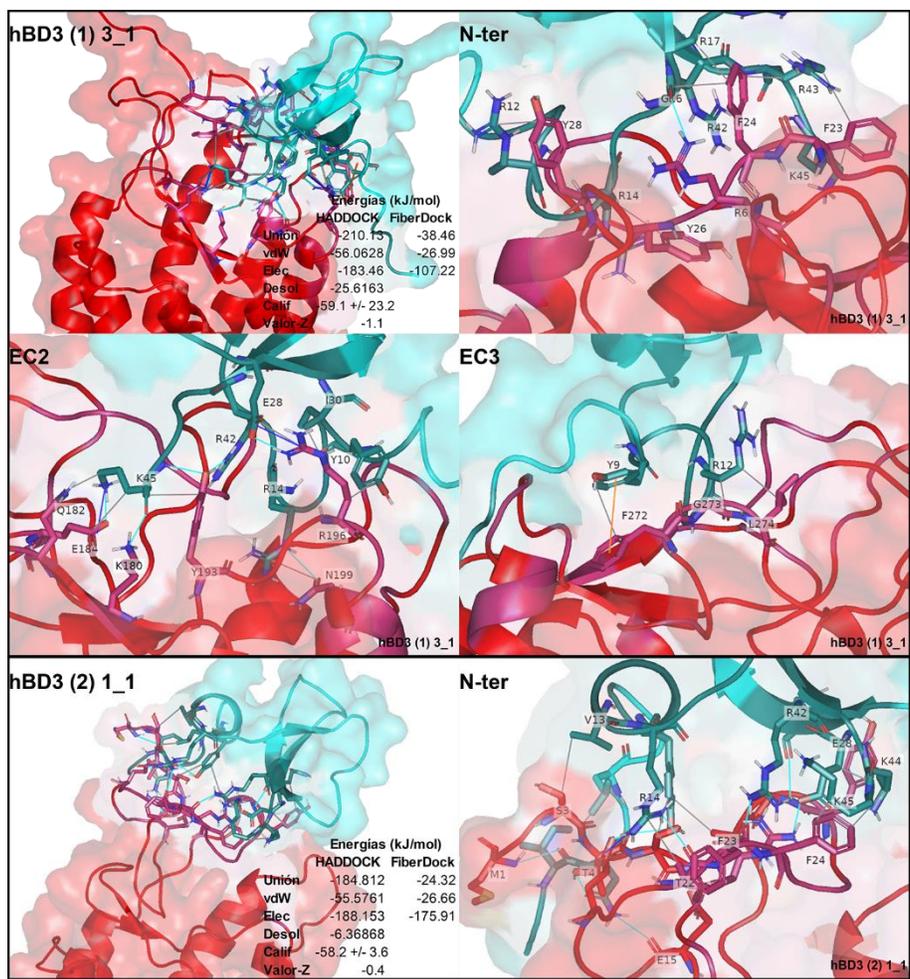


Figura 31. Contactos entre CCR2 y hBD3. En la imagen se muestran los contactos obtenidos con RING 2.0 y la interfaz de contactos obtenida con CoCoMaps, las líneas grises representan a las uniones de van der Waals, las azules a puentes hidrogeno, y las naranjas a apilamientos π - π . CCR2 se muestra de color rojo y en la región de la interfaz de color rosa cálido, hBD3 se muestra de color cian y la región de la interfaz de color verde azulado. La superficie está en 0.65 de transparencia y 0.9 en la interfaz. Colores PyMol: red, warmpink, cyan, deepteal.

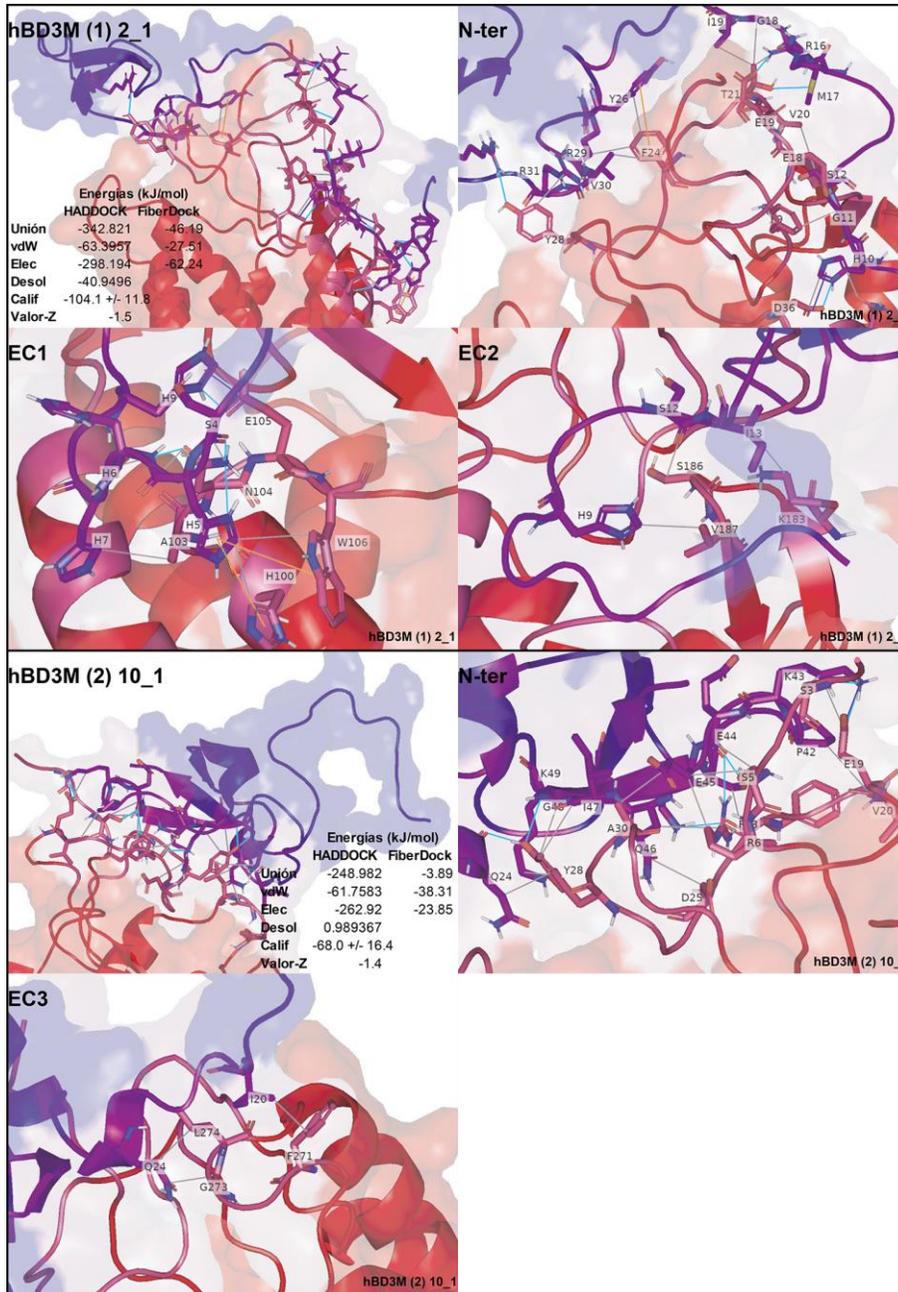


Figura 32. Contactos entre CCR2 y hBD3M. En la imagen se muestran los contactos obtenidos con *RING 2.0* y la interfaz de contactos obtenida con *CoCoMaps*, las líneas grises representan a las uniones de van der Waals, las azules a puentes hidrogeno, y las naranjas a apilamientos π - π . CCR2 se muestra de color rojo y en la región de la interfaz de color rosa cálido, hBD3M se muestra de color azul y la región de la interfaz de color azul morado. La superficie está en 0.65 de transparencia y 0.9 en la interfaz. Colores *PyMol*: red, warmpink, blue, purpleblue.

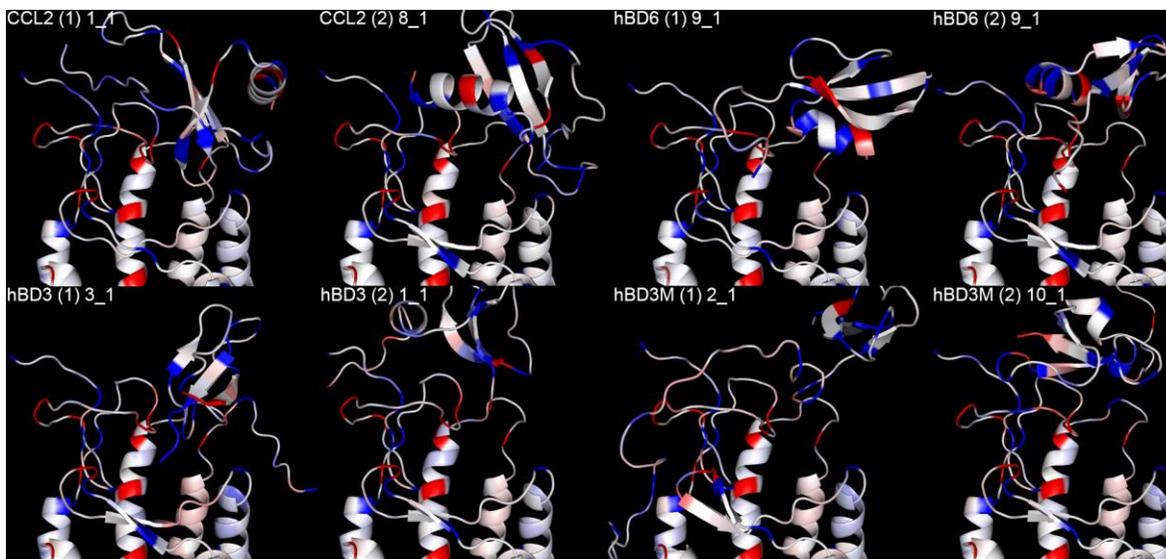
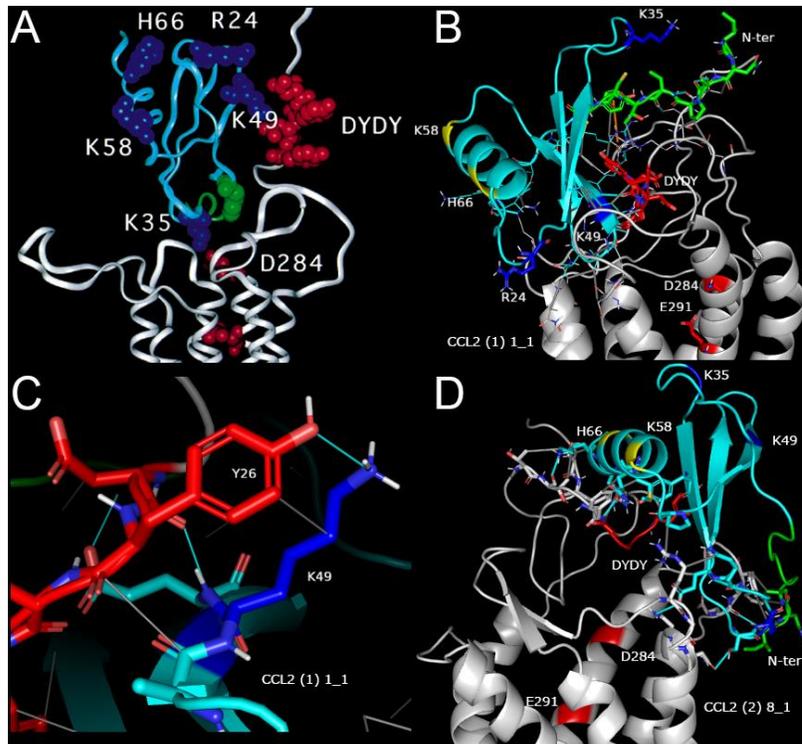


Figura 33. Aportaciones energéticas residuo por residuo de los complejos finales. Aportaciones energéticas según *g_mmpbsa*, la escala de colores indica la carga de la energía libre (ΔG), rojo para aportaciones negativas, blanco para aportaciones ≈ 0 kJ/mol y azul para aportaciones positivas.

7.7 Comparación de complejos

El acoplamiento de CCR2 con CCL2 y hBD6 se realizó como control para poder evaluar las interacciones con hBD3 y HBD3M. Con CCL2 (Figura 34) se pudo obtener un complejo, CCL2 (2) 1_1, muy parecido a un modelo propuesto por Hemmerich et al., (1999), en el que los residuos K49 y R24 de CCL2 están cerca de la región DYDY (Figura 34C), al mismo tiempo que los residuos K58 y H66 están mirando opuestamente a la interfaz de unión y que el N-terminal del péptido es orientado hacia el receptor y el residuo K35 de CCL2 está cercano al residuo D284 de CCR2. En contraste con nuestro complejo, se encontró a K49 en contacto con la región DYDY y a K58 y H66 opuestos a la interfaz y al N-terminal del péptido interactuando con la parte superior del N-terminal de CCR2. En el caso de hBD6 hay que tomar en cuenta que el modelo usado solo emplea al N-terminal del receptor (Figura 35). El modelo más cercano al propuesto por De Paula et al., (2013) fue el complejo hBD6 (2) 9_1, en el que el péptido interactúa principalmente con el N-terminal. En este complejo la Y28 de CCR2 interactúa con la F1 y F2 de hBD6, formando enlaces de apilamiento π , además la F2 de hBD6 interactúa con los D25 y D27.



1

Figura 34. Comparación de acoplamiento de CCL2. A) se muestra una comparación de los dos complejos seleccionados contra la información en la literatura (Hemmerich et al., 1999). B) complejo CCL2 (1) 1_1, C) acercamiento a la interacción entre Y26 de CCR2 y K49 de CCL2 en el complejo CCL2 (1) 1_1, y D) complejo CCL2 (2) 8_1. Se conservó el esquema de colores de la figura original a excepción de los residuos K58 y H66, los cuales se indica están opuestos a la interfaz de unión.

Los complejos generados no pueden representar completamente la unión de los péptidos con CCR2, pero en el caso de CCL2 se puede considerar al complejo CCL2 (1) 1_1 como algo fiable, ya que cumple ciertas características del modelo anteriormente mencionado. Esto se puede deber, como ya se mencionó, a su volumen y a las características de los residuos, siendo que tiene una pequeña región con carga negativa (Figura 26), la cual puede afectar la orientación con la que el péptido entra en contacto con el receptor. Además, se cumple que la región hidrofóbica del péptido, donde se encuentran los residuos R24 y K49, entra en contacto con la región DYDY del receptor. hBD6 igualmente contiene parches con cargas negativas (Figura 26) los cuales no interactúan con la región DYDY del receptor. hBD3, por el contrario, no posee parches con carga negativa y posee una superficie mayormente positiva.

aromáticos en el caso de hBD6, es suficiente para desencadenar la vía de señalización de CCR2, pero sí permite resaltar y proponer la importancia de estos residuos en la unión.

8 Discusión

Las herramientas *in silico* son útiles para entender fenómenos que, de otra manera, serían difícil de observar. En este caso, se trata de la unión de un receptor a su ligando, con lo cual se pretende proponer modelos que pueden brindar una idea sobre cómo es que se lleva a cabo esta unión (Dar & Mir, 2017; Vyas, Ukawala, Chinthra, & Ghate, 2012). Para el modelado de proteínas y péptidos existen varias alternativas, de las cuales resaltan tres, el modelado *ab initio*, el comparativo y la búsqueda de plegamientos (*threading*). Dependiendo de la información que se tenga disponible, al inicio del modelado, sobre la proteína de interés se va a emplear alguno de estos métodos (MacKerell et al., 1998; Šali & Blundell, 1993; Zhang, 2008). Cuando se pueden encontrar secuencias homólogas con estructura terciaria revelada ya sea por cristalografía de rayos X, criomicroscopía electrónica o resonancia magnética nuclear, se puede emplear el modelado comparativo, por homología. Generalmente, una homología igual o mayor al 30% puede generar buenos modelos, pero también influyen la identidad y el *valor e* (Šali, Webb, Madhusudhan, Shen, & Dong, 2018). Si no se encuentran secuencias con buena homología y si particularmente se quiere predecir la estructura de una proteína grande, se puede emplear en modelado por *threading*, el cual buscará los dominios en la secuencia y los comparará con dominios de estructuras ya conocidas, formando una estructura como “mosaico” de otras estructuras diferentes (J. Yang et al., 2014). Finalmente, si no hay secuencias con buena homología, o no se encuentran los suficientes dominios y regiones para predecir la estructura por *threading*, se emplea el método *ab initio*, el cual generará una estructura de acuerdo con las características químicas y físicas de los aminoácidos que componen a la secuencia. De esta manera, se trata de imitar al plegamiento natural. Una limitante importante en este método es el tamaño de la secuencia, sin embargo, algunos programas pueden generar modelos con secuencias de hasta 60 -100 residuos

(Khan, Wei, Gu, Hassan, & Tabrez, 2016; MacKerell et al., 1998). Cabe mencionar que se pueden generar modelos más fiables con el modelado por homología; ya que en este se buscan estructuras proteicas que tengan cierto grado de homología, identidad igual o mayor al 30%, a un mayor grado de homología mayor fiabilidad del modelo (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019; Vyas et al., 2012). Con el acoplamiento molecular se buscan las poses con las que un ligando, sea proteína, péptido o fármaco, se presenta e interactúa ante una proteína, en este caso puede ser un receptor y ligando o la formación de una estructura cuaternaria (Macalino et al., 2018). Para esto, existen diversos programas que generalmente presentan su propio protocolo para generar dichas poses sobre una proteína. Por lo que, con lo antes mencionado, se pueden obtener acoplamientos en los que los participantes tengan mayor libertad al formar conformaciones o en los que el receptor se mantenga rígido en su posición. Con todos los programas existentes se busca dar aproximaciones a lo que puede pasar en la vida real (Ciemny et al., 2018). Igual que con el modelado por homología el tipo de acoplamiento varía según el protocolo y programa que se utilice. En la mayoría de los casos, el software de trabajo dará la opción de seleccionar los residuos que interactúan en el complejo que se quiere encontrar. Para esto se necesita de información previa y generalmente generará modelos confiables (Dominguez, Boelens, & Bonvin, 2003; Kozakov, Hall, et al., n.d.). Cuando no se cuenta con información sobre la interfaz de unión, se opta por un acoplamiento ciego para encontrar poses de unión de acuerdo a las características de las moléculas participantes (Elokely & Doerksen, 2013; Gupta, Pallavi, & Bhatnagar, 2016). Se debe de tener en cuenta también que el acoplamiento ciego sirve para corroborar la robustez del programa; si el complejo generado es parecido al complejo observado por métodos *in vitro*, esto se verá reflejado en el RMSD del complejo predicho *in silico* y el revelado *in vitro* (Agrawal et al., 2019; Kozakov, Beglov, et al., n.d.). *esta referencia está rara*

En este trabajo se quiso entender cómo los péptidos de defensa del hospedero, o péptidos antimicrobianos, pueden interactuar con elementos del sistema inmune. Para esto, se escogió a la defensina recombinante hBD3M y a un receptor con el

que se ha propuesto que interactúa, CCR2. En el modelado de hBD3M se quiso modelar la cola de histidinas que se le añadió para facilitar su purificación por expresión recombinante, por esto se escogió como plantilla a la estructura de HBD3, a esto se debe que la identidad sea del 100% y la única diferencia sea dicho elemento (Schibli et al., 2002). En el caso de CCR2, se escogió como plantilla a una estructura de CCR5 unido a gp120 y a una proteína de membrana de HIV (Shaik et al., 2019). En este caso, hubo una identidad del 79.31, algo que se consideró fue que la estructura tuviera una buena parte del N-terminal del receptor, por eso se escogió este modelo en lugar de los modelos de CCR2 que presentaban mayor identidad (Apel et al., 2019; Shaik et al., 2019; Zheng et al., 2016). Diversos grupos han realizado modelado por homología de defensinas, tales como Suresh & Verma (2006), Siqueira et al., (2016) y Dhananjeyan, Sivaperumal, Paramasivan, Thenmozhi, & Tyagi (2009). En el primero se crearon modelos para la estudiar las características fisicoquímicas de la defensina de oveja 2, sBD2, esto a través de la dinámica molecular. En el segundo se utilizó la estructura de la hBD2 para crear modelos de defensinas homólogas que se encuentran en otros mamíferos, particularmente en este estudio encontraron que estas defensinas, a pesar de ser homólogas, van a tener mejor actividad antimicrobiana como monómeros en unas especies y como dímeros en otras. Mientras que, en el tercero, crearon estructuras de tres defensinas del mosquito *Aedes aegypti*, esto con el fin de comprender el sistema inmune de estos mosquitos y en un futuro proponer soluciones a las enfermedades transmitidas por vectores, en este caso del dengue. Esto resalta la importancia del estudio de péptidos antimicrobianos y de defensa del hospedero, ya que dependiendo del organismo y del tipo de péptido puede haber una gran variedad en la que estos péptidos actúan en la defensa inmune. Además, que el estudio de estos péptidos con métodos *in silico* puede acelerar la propuesta de soluciones ante temas de salud actuales de importancia.

Una vez generados los modelos se escogieron aquellos con valores RMSD y DOPE dentro del promedio y media, y que también tuvieran buenos valores *ERATT* y gráficos de Ramachandran. Para mejorar los modelos se realizó el refinamiento de

las asas EC1 y EC3, no se escogió a EC2 para el refinamiento para mantener el puente disulfuro entre el N-terminal y EC2, el cual es característico de los receptores CCR (Hughes & Nibbs, 2018). Con el refinamiento se vio una mejora en los valores *ERRAT* de los modelos, incluso se vio una mejora en el EC3, esto se puede interpretar como la pérdida de choques estéricos. Finalmente, se realizó una minimización de energía de los modelos para hBD3M y CCR2, y al igual que en los modelos previos hubo una mejora en los valores *ERRAT* para ambos casos. Estos métodos de validación son útiles tanto para la creación de modelos *in silico*, como para la propuesta de estructuras por métodos *in vitro*. Otros grupos han propuesto modelos de CCR2, el grupo Kothandan, Gadhe, & Cho (2012), que además de proponer una estructura para CCR2 también lo hizo para CCR5, esto con el fin de observar la dinámica del receptor al interactuar con fármacos pequeños, y el grupo de Shi et al., (2002), donde a partir de su estructura propuesta por homología, hicieron dinámica molecular de su modelo dentro de una membrana y de esta manera encontraron los residuos importantes para la función del receptor.

Ciertos procedimientos post modelado/acoplamiento pueden mejorar la disposición espacial de los átomos en los modelos y complejos (Khan et al., 2016). En el caso del modelado por homología, uno de ellos es el refinamiento de asas, que ayuda a encontrar conformaciones más estables de las asas presentes en una proteína. En el caso de *MODELLER* el refinamiento usa como referencia la librería de estructuras de asas en la PDB, mientras que otros métodos se basan en dinámicas moleculares (Šali et al., 2018). En el desarrollo de nuestros modelos se usó el refinamiento de asas para quitar los choques estéricos que se observaban en las gráficas *ERRAT*, Figura 11, en las cuales se observaron choques estéricos. Es de gran importancia el modelado de las asas debido a que estas zonas pueden ser las más cambiantes entre homólogos y suelen estar presentes en los sitios activos y de unión en una proteína (Macalino et al., 2018).

Otros procedimientos útiles en el modelado y acoplamiento son las mecánicas y dinámicas moleculares. La primera se emplea en la minimización de energía, lo cual compone los choques estéricos de los modelos, y la segunda es útil para ver el

comportamiento de la proteína, péptido o complejo generado en ciertas condiciones, en vacío, solvente, solvente con iones cargados, solvente con iones neutralizantes, entre otros (Hospital, Goñi, Orozco, & Gelpí, 2015). En este proyecto no se llevaron a cabo dichos estudios debido a la limitante del tiempo y el equipo computacional necesario, pero diversos laboratorios han aplicado estas pruebas en diversos péptido y receptores. Dependiendo del fin del estudio se puede estudiar solamente a una molécula en solvente, que en el caso de los péptidos ayuda a entender el comportamiento de este en solvente y cercano a membrana (Velasco-Bolom, Corzo, & Garduño-Juárez, 2019). En el caso de receptores se puede aplicar para observar los cambios conformacionales de la proteína, ya sea que esté sola en solvente, insertada en una membrana, en cercanía o en contacto con algún ligando (Dutta, Botlani, & Varma, 2014; Hospital et al., 2015; Shi et al., 2002; B. C. Taylor, Lee, & Amaro, 2019).

Para estudiar la interacción de HBD3M con CCR2 se optó por realizar dos acoplamientos, uno global y otro de reacoplamiento, para así hacer un escaneo de los contactos más frecuentes en los complejos y determinar cuáles son los que aportan energía a la unión. Tomando en cuenta que la energía libre de los residuos de los ligandos no es constante, se pueden simplificar los residuos activos en la unión a aquellos del N-terminal, en caso de aportar energía, y a los residuos cargados, debido a que son los que más aportan a la unión. *HADDOCK* da la opción de elegir residuos “pasivos”, que pueden o no participar en la unión, en los péptidos se tomaron como pasivos aquellos residuos que no sean parte del N-ter y que sean cargados. Por parte del receptor, se observó que los residuos pasivos fueron los que no aportan energía libre a la unión, pero que son parte de las regiones extracelulares. Como resultado, en ambos acoplamientos se encontró que las defensinas tienen fuerzas de unión muy cercanas al ligando nativo CCL2, algo que se puede destacar es que las energías por fuerzas de van der Waals son más negativas en CCL2 y parecidas entre las tres defensinas. Ya se ha propuesto que CCR2 es promiscuo en cuanto a la unión a ligandos (Hughes & Nibbs, 2018), y esto podría apoyar esta teoría. Parece existir una buena relación entre las defensinas y

los receptores de quimiocinas, ya que se ha encontrado que CCR6 es activado por las defensinas hBD1 y 2 (K. Taylor, Barran, & Dorin, 2008), también de hBD3 puede interactuar con CXCR4 (Feng, Dubyak, Jia, Lubkowski, & Weinberg, 2013), y con respecto a otro péptidos se ha reportado que LL-37 puede actuar como quimioatrayente a través del receptor FPRL1 (D. Yang et al., 2000).

Las aportaciones energéticas, residuo por residuo, se muestran en la Figura 33. En general, se observa un patrón muy consistente de aportaciones por parte de CCR2. Resulta interesante que pareciera ser que las tirosinas de la región DYDY no aportan energía libre, ni positiva ni negativa, y son los aspartatos los que aportan energía libre negativa a la unión. Por otro lado, en el caso de HBD3M, se observó una mayor tendencia a formar contactos por fuerzas de van der Waals, igual que con hBD3, pero parece que la cola de histidinas impide una unión similar a la observada con hBD3. Cabe mencionar que, en uno de los complejos la cola de histidinas rodea al receptor por una región del N-terminal, que posee carga negativa, mientras que, la región correspondiente al péptido original hace contacto con la cavidad, de ser esto posible implicaría una mayor afinidad, pero podría no ser relevante para la activación de CCR2. Para confirmar que esto favorece la activación del receptor se necesitaría otro enfoque para vislumbrar la unión de HBD3M con CCR2 y determinar la activación de cascadas de señalización, que se ha reportado que CCR2 moviliza a monocitos de la médula ósea a sangre, y a células Th1 (Chen et al., 2018). Para determinar qué tipo de células son quimioatraídas por CCR2 al unírsele hBD3 y HBD3M se podrían realizar ensayos de quimiotaxis con diferentes tipos células del sistema inmune, también se podrían hacer marcadores para identificar si hay algún tipo celular que exprese CCR2, al que hBD3 y HBD3M sean más propensos a unirse, y así entender un poco del contexto celular de la unión. Finalmente, hay que resaltar que en estos acoplamientos no se trabajó con las tirosinas Y26 y Y28 sulfatadas del receptor; se sabe que esta modificación postraducciona aumenta la afinidad a los ligandos, como ocurre con CCL2 y hBD6 (De Paula et al., 2013; Monteclaro & Charo, 1996). Por lo tanto, también podría cambiar la orientación de los ligandos sobre el receptor.

Dado que hBD3 y HBD3M son catiónicos, homólogos a hBD6 y a que los sitios de unión del receptor son de carácter aniónico, es de esperarse que haya unión similar entre estos péptidos y el receptor. Mientras que, en hBD6 la interacción con la región DYDY del receptor se da con los residuos aromáticos del N-terminal del péptido, tanto hBD3 como hBD3M interactúan con esta región por medio de residuos catiónicos y en menor medida con aromáticos, algo más parecido a la unión con CCL2 (Monteclaro & Charo, 1996; Shi et al., 2002).

Para CCR2 se ha propuesto un modelo de unión a ligandos donde la primera interacción se da con el N-terminal y de ahí el ligando se acerca a las regiones extracelulares (Monteclaro & Charo, 1996, 1997), para después interactuar con las regiones transmembranales (Hughes & Nibbs, 2018). Por esta razón, se escogieron dos modelos para analizar los complejos generados, uno con el ligando en la parte superior del receptor y otro más cercano a la cavidad formada por el N-terminal y las regiones extracelulares: EC2 y EC3. En el caso de CCL2, se puede observar que el péptido ocupa gran parte del área exterior del receptor donde se encuentra la cavidad N23, esto debido su volumen, 8872.3 \AA^3 (según ProteinVolume 1.3; (Chen & Makhatadze, 2015)). Mientras que, hBD3 y hBD6 tienen un volumen de 5968.9 y 5700.7 \AA^3 , respectivamente. Estos dos péptidos se encontraron en dos estados: unidos solamente al N-terminal y unidos al N-terminal y a las regiones EC2 y EC3, Figura 30 y 31. También se pudo observar que, en su mayoría, las interacciones de los péptidos con el N-ter de CCR2 se dan por fuerzas de van der Waals, Figuras 29 - 32. Con respecto a HBD3M, pueden existir dos maneras en las que entre en contacto con el receptor, con la región del péptido original y con la cola de histidinas, la cual, como se observó en el acoplamiento, tiene cierta afinidad por la región externa del N-terminal. De igual forma, el resultado sería que el péptido entre en contacto con la cavidad N23. Esto es algo que se ha observado previamente en receptores acoplados a proteína G, especialmente en aquellos que reconocen citocinas; el primer contacto de los ligandos se da con en su N-terminal, y después son atraídos a las demás regiones extracelulares, e incluso los ligandos

pueden interactuar con residuos de las regiones transmembranales (Hughes & Nibbs, 2018).

Si bien los modelos propuestos fueron analizados y comparados con diversos resultados, para tener una referencia que nos hablara de su fiabilidad, es posible proponer mejores modelos. Esto mediante un reacoplamiento con las tirosinas de la región DYDY sulfatadas, para así observar los cambios que podrían darse en una dinámica molecular. Especialmente con los complejos donde el ligando está en contacto solo con el N-terminal de CCR2, con lo que se corroboraría si son atraídos hacia las asas de la región extracelular. Igualmente, observando los cambios en las aportaciones energéticas, se podría tener un mejor entendimiento sobre el patrón observado en CCR2 y si este se relaciona con la activación de la vía de señalización o si es que ciertos residuos deben ser activados para que el receptor inicie su función. Algo interesante es que se ha reportado la importancia de los residuos transmembranales D284 y E291 en la unión con CCL2, Figura 34A, y en las aportaciones energéticas residuo por residuo, Figura 33, estos aparecen activados con un ΔG negativo en todos los complejos. Cabe mencionar que, para poder validar los resultados obtenidos por acoplamiento en este trabajo, se debe pasar de la experimentación *in silico* a la *in vitro*, para así poder determinar las fuerzas de unión y constantes de disociación de los complejos por medio de titulaciones, la eficacia con la que se activa el receptor con ensayos de quimiotaxis y la importancia de los residuos por medio de mutagénesis. Diferentes grupos se han apoyado en técnicas *in silico* para posteriormente corroborar o relacionarlos a estudios *in vitro* (Cava & Castiglioni, 2020; Jeong, Kim, & Choi, 2019; Naha, Govindaiah, Sreenivasa, Prakash, & Velmathi, 2020; Subhashree et al., 2017), ya sea para encontrar ligandos/fármacos con buena afinidad al receptor, reducir la agresividad de un agente *in silico* para mejorar terapias con toxinas u otro tipo de proteínas, o simplemente para ahorrar tiempo y dinero que se podría gastar si solo se realizaran estudios *in vitro* o *in vivo*. Seguir con este estudio a través de este enfoque podría llevar a entender mejor el funcionamiento de hBD3, HBD3M y demás péptidos

antimicrobianos y de defensa en el sistema inmune, y así ser capaz de crear nuevas terapias basadas en estos péptidos.

Para avanzar en la comprensión de la interacción de los péptidos antimicrobianos y de defensa del hospedero es de interés hacer un escaneo más grande, con diferentes péptidos y receptores. Estos péptidos podrían ser un buen paso para combatir la inminente resistencia a antibióticos, dado a que raramente generan resistencia en patógenos y a su capacidad de promover ciertas actividades de la respuesta inmune por lo cual podrían o no interactuar directamente con los patógenos (Afacan, Yeung, Pena, & Hancock, 2012; Hancock, Nijnik, & Philpott, 2012). Para esto es necesario entender como interactúan con los patógenos y que función del sistema inmune son capaces de promover o inhibir, también es necesario saber qué características de estos son las que les permite ejercer su función. Algunos péptidos ya se han estudiado en cuanto a su función antimicrobiana, tal es el caso de hBD3M el cual se muestra eficaz en el tratamiento de heridas cutáneas en conejos (Ibarra Valencia, 2017). Ahora se le puede atribuir una función quimioatrayente.

Finalmente, se debe recalcar que los métodos *in silico* ofrecen una gran ventaja en el modelado de estructuras, ya sean terciarias, en el caso de una sola proteína o péptido, o cuaternarias, en el caso de complejos proteicos. También es importante mencionar que el método empleado dependerá del tipo de molécula. En el grupo del doctor Gerardo Corzo no solo se trabaja con defensinas, sino con una gran variedad de péptidos con diferentes orígenes, la mayoría con funciones terapéuticas. Implementar estos métodos de análisis al estudio de péptidos antimicrobianos y de defensa del hospedero nos ayudará a entender cómo actúan y bajo qué contexto, para de esta manera determinar cuáles son los que pueden resultar en un agente farmacológico de mayor relevancia.

9 Conclusiones

- La unión de ligandos a CCR2 forma una cavidad con las regiones extracelulares del receptor.
- Los aspartatos de la región DYDY del receptor aportan energía libre negativa, mientras que las tirosinas forman contactos con los ligandos.
- Las interacciones de van der Waals favorecen la afinidad de los ligandos.
- La cationicidad de los péptidos favorece la unión a CCR2.
- hBD3M tienen una carga electrostática positiva prominente en su superficie lo que favorece la unión a CCR2.
- La unión de hBD3M con CCR2 podría darse tanto por la región del péptido original como por la cola de histidinas, la cual mostró tener afinidad por la parte trasera de la cavidad.

10 Perspectivas

- Determinar la afinidad y aportaciones energéticas de los complejos generados por medio de dinámica molecular.
- Determinar la importancia de los residuos en la unión por medio de mutagénesis *in silico* y corroborarlos *in vitro*.
- Llevar a cabo ensayos de quimiotaxis para evaluar la actividad del receptor unido a los diferentes ligandos.
- Proponer nuevos receptores del sistema inmune con los que hBD3M pueda interactuar.

11 Referencias

- Afacan, N. J., Yeung, A. T. Y., Pena, O. M., & Hancock, R. E. W. (2012). Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. *Current Pharmaceutical Design*, 18(6), 807–819. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22236127>
- Agrawal, P., Singh, H., Srivastava, H. K., Singh, S., Kishore, G., & Raghava, G. P. S. S. (2019). Benchmarking of different molecular docking methods for protein-peptide docking. *BMC Bioinformatics*, 19(Suppl 13), 426. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2449-y>
- Apel, A. K., Cheng, R. K. Y., Tautermann, C. S., Brauchle, M., Huang, C. Y., Pautsch, A., ... Schnapp, G. (2019). Crystal Structure of CC Chemokine Receptor 2A in Complex with an Orthosteric Antagonist Provides Insights for the Design of Selective Antagonists. *Structure*, 27, 427-438.e5. <https://doi.org/10.2210/PDB6GPS/PDB>
- Cava, C., & Castiglioni, I. (2020). Integration of Molecular Docking and In Vitro Studies: A Powerful Approach for Drug Discovery in Breast Cancer. *Applied Sciences*, 10(19), 6981. <https://doi.org/10.3390/app10196981>
- Chen, K., Bao, Z., Tang, P., Gong, W., Yoshimura, T., & Wang, J. M. (2018, April 1). Chemokines in homeostasis and diseases. *Cellular and Molecular Immunology*, Vol. 15, pp. 324–334. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.134>
- Ciemny, M., Kurcinski, M., Kamel, K., Kolinski, A., Alam, N., Schueler-Furman, O., & Kmiecik, S. (2018). Protein-peptide docking: opportunities and challenges. *Drug Discovery Today*, 23(8), 1530–1537. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.006>
- Dar, A. M., & Mir, S. (2017). Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 08(02), 8–10. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000356>
- De Paula, V. S., Gomes, N. S. F., Lima, L. G., Miyamoto, C. A., Monteiro, R. Q., Almeida, F. C. L., & Valente, A. P. (2013). Structural Basis for the Interaction of Human β -Defensin 6 and Its Putative Chemokine Receptor CCR2 and Breast Cancer Microvesicles. *Journal of Molecular Biology*, 425(22), 4479–4495. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.08.001>
- Dhananjeyan, K. J., Sivaperumal, R., Paramasivan, R., Thenmozhi, V., & Tyagi, B. K. (2009). In-silico homology modeling of three isoforms of insect defensins from the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* (Linn., 1762). *Journal of Molecular Modeling*, 15(5), 507–514. <https://doi.org/10.1007/s00894-008-0408-7>
- Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. J. J. (2003). HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7), 1731–1737. <https://doi.org/10.1021/ja026939x>

- Dutta, P., Botlani, M., & Varma, S. (2014). Water Dynamics at Protein–Protein Interfaces: Molecular Dynamics Study of Virus–Host Receptor Complexes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 141212105050009. <https://doi.org/10.1021/jp5089096>
- Elokely, K. M., & Doerksen, R. J. (2013). Docking challenge: Protein sampling and molecular docking performance. *J Chem Inf Model*, 53(8), 1934–1945. <https://doi.org/10.1021/ci400040d>
- Feng, Z., Dubyak, G. R., Jia, X., Lubkowski, J. T., & Weinberg, A. (2013). Human β -defensin-3 structure motifs that are important in CXCR4 antagonism. *FEBS Journal*, 280(14), 3365–3375. <https://doi.org/10.1111/febs.12328>
- Gupta, A., Pallavi, M., & Bhatnagar, S. (2016). *Methods and Algorithms for Molecular Docking-Based Drug Design and Discovery*. (February 2018). <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-0115-2>
- Hancock, R. E. W., Nijnik, A., & Philpott, D. J. (2012). Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 243–254. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2745>
- Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M., & Gelpí, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: Advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, Vol. 8, pp. 37–47. <https://doi.org/10.2147/AABC.S70333>
- Hughes, C. E., & Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *FEBS Journal*, 285(16), 2944–2971. <https://doi.org/10.1111/febs.14466>
- Ibarra Valencia, M. A. (2017). *Acción de péptidos antimicrobianos en infecciones tóxicas en animales modelo*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
- Jeong, J., Kim, H., & Choi, J. (2019). In Silico Molecular Docking and In Vivo Validation with *Caenorhabditis elegans* to Discover Molecular Initiating Events in Adverse Outcome Pathway Framework: Case Study on Endocrine-Disrupting Chemicals with Estrogen and Androgen Receptors. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1209. <https://doi.org/10.3390/ijms20051209>
- Khan, F. I., Wei, D. Q., Gu, K. R., Hassan, M. I., & Tabrez, S. (2016). Current updates on computer aided protein modeling and designing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.072>
- Kothandan, G., Gadhe, C. G., & Cho, S. J. (2012). Structural Insights from Binding Poses of CCR2 and CCR5 with Clinically Important Antagonists: A Combined In Silico Study. *PLoS ONE*, 7(3), e32864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032864>
- Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., & Vajda, S. (n.d.). *How Good is Automated Protein Docking?*

<https://doi.org/10.1002/prot.24403>

- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., ... Vajda, S. (n.d.). *The ClusPro web server for protein-protein docking*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Macalino, S. J. Y., Basith, S., Clavio, N. A. B., Chang, H., Kang, S., & Choi, S. (2018). Evolution of in silico strategies for protein-protein interaction drug discovery. *Molecules*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/molecules23081963>
- MackKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., ... Karplus, M. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins †. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18), 3586–3616. <https://doi.org/10.1021/jp973084f>
- Montecarlo, F. S., & Charo, I. F. (1996). The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1 α receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19084–19092. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.32.19084>
- Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E. (2019). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(1), 12–20. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13388>
- Naha, S., Govindaiah, S., Sreenivasa, S., Prakash, J. K., & Velmathi, S. (2020). In Vitro, Molecular Docking, and In Silico Binding Mode Analysis of Organic Compounds for Antimicrobial and Anticancer Activity against Jurkat, HCT116, and A549 Cell Lines. *ChemistrySelect*, 5(41), 12807–12818. <https://doi.org/10.1002/slct.202003025>
- Šali, A., & Blundell, T. L. (1993). Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234(3), 779–815. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>
- Šali, A., Webb, B., Madhusudhan, M. S., Shen, M.-Y., & Dong, G. (2018). MODELLER, a program for Protein Structure Modeling. *Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints.*, 1–272. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>
- Schibli, D. J., Hunter, H. N., Aseyev, V., Starner, T. D., Wiencek, J. M., McCray, P. B., ... Vogel, H. J. (2002). The Solution Structures of the Human β -Defensins Lead to a Better Understanding of the Potent Bactericidal Activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8279–8289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108830200>
- Shaik, M. M., Peng, H., Lu, J., Rits-Volloch, S., Xu, C., Liao, M., & Chen, B. (2019). Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike. *Nature*, 565(7739), 318–323. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0804-9>
- Shi, X.-F., Liu, S., Xiangyu, J., Zhang, Y., Huang, J., Liu, S., & Liu, C.-Q. (2002).

- Structural analysis of human CCR2b and primate CCR2b by molecular modeling and molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Modeling*, 8(7), 217–222. <https://doi.org/10.1007/s00894-002-0089-6>
- Siqueira, A. S., de Souza, B. B., Lima, A. R. J., Barbosa, E. M., Azevedo, J. S. N., Gonçalves, E. C., & Silva Filho, E. (2016). Homology modeling and molecular dynamics of β -defensin II variants in Amazonian sheep. *Genetics and Molecular Research*, 15(1). <https://doi.org/10.4238/gmr.15017469>
- Subhashree, G. R., Haribabu, J., Saranya, S., Yuvaraj, P., Anantha Krishnan, D., Karvembu, R., & Gayathri, D. (2017). In vitro antioxidant, antiinflammatory and in silico molecular docking studies of thiosemicarbazones. *Journal of Molecular Structure*, 1145, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.05.054>
- Suresh, A., & Verma, C. (2006). Modelling study of dimerization in mammalian defensins. *BMC Bioinformatics*, 7(S5), S17. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-S5-S17>
- Taylor, B. C., Lee, C. T., & Amaro, R. E. (2019). Structural basis for ligand modulation of the CCR2 conformational landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(17), 8131–8136. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814131116>
- Taylor, K., Barran, P. E., & Dorin, J. R. (2008). Structure-activity relationships in β -defensin peptides. *Biopolymers*, 90(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/bip.20900>
- Velasco-Bolom, J.-L., Corzo, G., & Garduño-Juárez, R. (2019). Folding profiles of antimicrobial scorpion venom-derived peptides on hydrophobic surfaces: a molecular dynamics study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1648319>
- Vyas, V., Ukawala, R., Chintla, C., & Ghate, M. (2012). Homology modeling a fast tool for drug discovery: Current perspectives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(1), 1. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.102537>
- Yang, D., Chen, Q., Stoll, S., Chen, X., Howard, O. M. Z., & Oppenheim, J. J. (2000). Differential Regulation of Responsiveness to fMLP and C5a Upon Dendritic Cell Maturation: Correlation with Receptor Expression. *The Journal of Immunology*, 165(5), 2694–2702. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2694>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- Zheng, Y., Qin, L., Zacarías, N. V. O., de Vries, H., Han, G. W., Gustavsson, M., ... Handel, T. M. (2016). Structure of CC chemokine receptor 2 with orthosteric and allosteric antagonists. *Nature*, 540(7633), 458–461. <https://doi.org/10.1038/nature20605>

Anexo I

Alineamiento de secuencias con *T-COFFEE* extensión de homología de los modelos encontrados con *NCBI BLAST* de proteínas para el modelado de CCR2. Las secuencias de los modelos se obtuvieron del archivo fasta en sus respectivas entradas en la *Protein Data Bank*.

Las regiones de interés de CCR2 se encuentran subrayadas y los residuos con ocupancia cero de los modelos se encuentran tachados.

T-COFFEE, Version 11.00.d625267 (2016-01-11 15:25:41 - Revision d625267 - Build 507)

Cedric Notredame

CPU TIME:0 sec.

SCORE=986

*

BAD AVG GOOD

*

NP_001116513.2 : 99
5T1A_A : 98
cons : 98

NP_001116513.2 -----MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLPPLYSLVFIFG
5T1A_A DYKDDDDKPGTFLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLPPLYSLVFIFG
cons *****

NP_001116513.2 FVGNMLVVLILINCKKLCCLTDIYLLNLAI SDLLFLITLPLWAHSAANEVWFGNAMCKLFTGLYHI
5T1A_A FVGNMLVVLILINCKKLCCLTDIYLLNLAI SDLLFLITLPLWAHSAANEVWFGNAMCKLFTGLYHI
cons *****

NP_001116513.2 GYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVY
5T1A_A GYFGGIFFIILLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVY
cons *****

NP_001116513.2 VCGPYFPRGWNFHFTIMRNILGLVLP LLIMVICYSGILKTL LRCRN-----
5T1A_A VCGPYFPRGWNFHFTIMRNILGLVLP LLIMVICYSGISRASKSRINIFEMLRIDEGLRLKIYKDE
cons ***** : * * * * *

NP_001116513.2 -----
5T1A_A GYYTIGIGHLLTKSPSLNAKSELDKAIGRNTNGVITKDEAEKLFNQDVDAAVRGILRNAKLPVY
cons * * * * *

NP_001116513.2 -----
5T1A_A DSLDAVRAALINMVFQMETGVAGFTNSLRMLQQKRWDEAAVNLA KSRWYNQTPNRAKRVI TTFR
cons * * * * *

NP_001116513.2 -----EKKRHRAVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTE
5T1A_A TGTWDAYPPPSREKKAVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTE
cons . : . : *****

NP_001116513.2 TLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRSLFHIALGCRIAPLQKPVCGGPGVRPGKNVKVTTQGLLDGRGKG
5T1A_A TLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRRLSVFRRKHI-----
cons ***** : : : * : * * * * *

NP_001116513.2 KSIGRAPEASLQDKEGA
5T1A_A KRFRPLEVLFQ-----
cons * : * * . * . : * * *

T-COFFEE, Version_11.00.d625267 (2016-01-11 15:25:41 - Revision d625267 - Build 507)

Cedric Notredame

CPU TIME:0 sec.

SCORE=997

*

BAD AVG GOOD

*

NP_001116513.2 : 99

6GPS_A : 99

cons : 99

NP_001116513.2 MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVVLI
6GPS_A E-STSRSRFIRNTQESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVVLI

cons : *****:*****

NP_001116513.2 LINCKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEWVFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFII
6GPS_A LINYKKLKCLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEWVFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFII

cons *** *****

NP_001116513.2 LLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGW
6GPS_A LLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPNIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGW

cons *****:*****

NP_001116513.2 NNFHTIMRNILGLVLP LLIMVICYSGILKTLRCR-----
6GPS_A NNFHTIMRNILGLVLP LLIMVICYSGILKTLRMKKTCTVCGYIYNPEDGDPDNGVNP GTDFKDI

cons *****:*****

NP_001116513.2 -----NEKKRHRAVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCS
6GPS_A PDDWVCPLCGVGKDQFEEVEEEKRHRDVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCS

cons *****:*****

NP_001116513.2 TSQLDQATQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRSLFHIALGCR IAPLQKPVCGGPGVRPGKNVKV
6GPS_A TSQLDQATQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEFRSLFHIALGCR IAPLQKPVCGGPGVRPGKNVKV

cons *****:*****

NP_001116513.2 TTQGLLDGRGKGSIGRAPEASLQDKEGA-----
6GPS_A TTQGLLDGRGKGSIGRAPEASLQDKEGA EVLFO

cons *****

T-COFFEE, Version_11.00.d625267 (2016-01-11 15:25:41 - Revision d625267 - Build 507)

Cedric Notredame

CPU TIME:0 sec.

SCORE=991

*

BAD AVG GOOD

*

NP_001116513.2 : 99

6GPX_A : 99

cons : 99

NP_001116513.2 MLSTSRSRFIRNTNESGEEVTTFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVVLI
6GPX_A -----GAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVVLI

cons *****

NP_001116513.2 LINCKKCLKLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEVWFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFII
6GPX_A LINYKCLKLTDIYLLNLAISDLLFLITLPLWAHSAANEVWFGNAMCKLFTGLYHIGYFGGIFII

cons *** *****

NP_001116513.2 LLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPGIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGW
6GPX_A LLTIDRYLAIVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWLVAVFASVPNIIFTKCQKEDSVYVCGPYFPRGW

cons *****

NP_001116513.2 NNFHTIMRNILGLVLP LLIMVICYSGILKTLRCR-----
6GPX_A NNFHTIMRNILGLVLP LLIMVICYSGILKTLRMKKTCTVCGYIYNPEDGDPDNGVNPGETDFKDI

cons ***** :

NP_001116513.2 -----NEKKRHRAVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCS
6GPX_A PDDWVCPLCGVGKDQFEEVEEKKRHRDVRVIFTIMIVYFLFWTPYNIVILLNTFQEFFGLSNCS

cons *****

NP_001116513.2 TSQLDQATQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRSLFHIALGCRIAPLQKPVCGGPGVRPGKNVKV
6GPX_A TSQLDQATQVTETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRSLFHIALGEVLFQ-----

cons ***** :

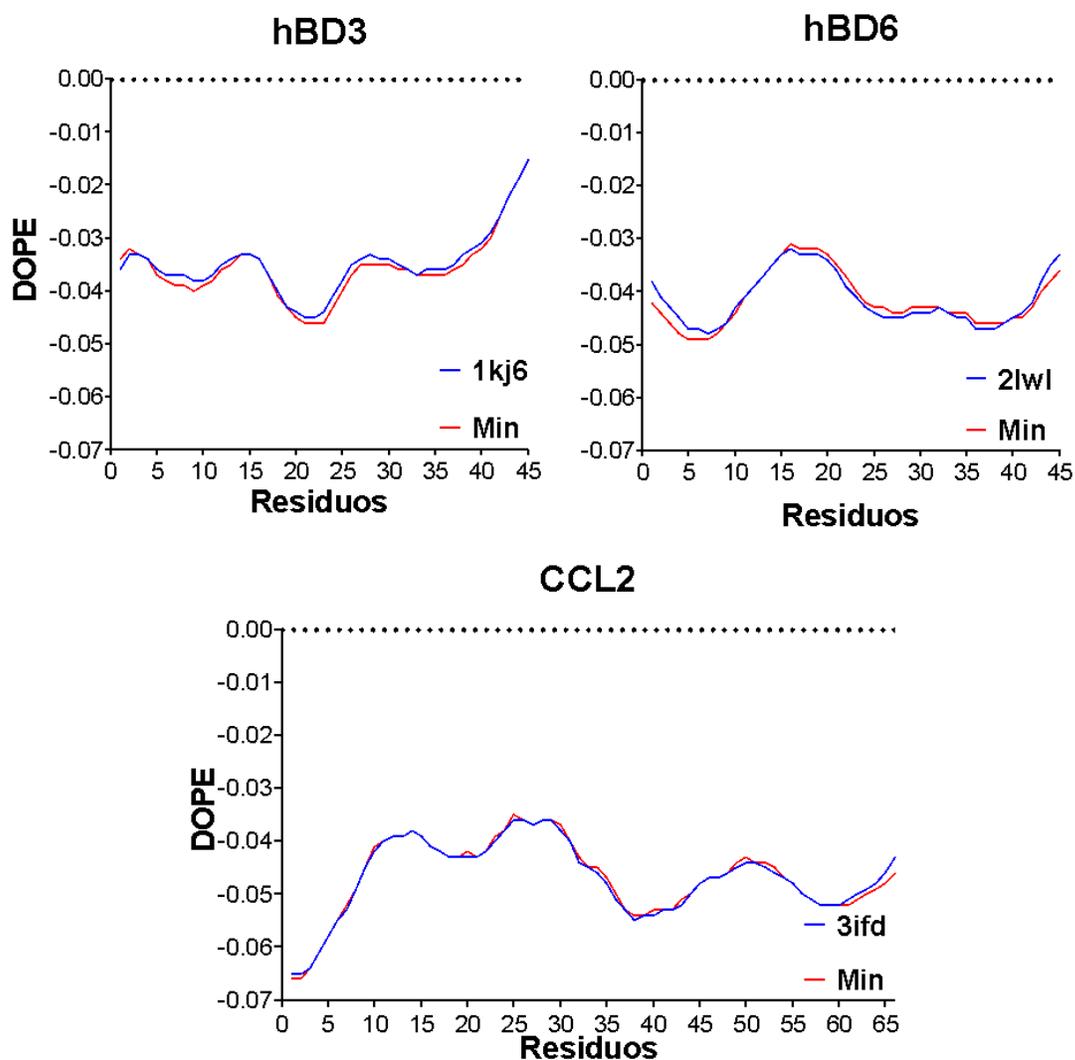
NP_001116513.2 TTQGLLDGRGKGSIGRAPEASLQDKEGA
6GPX_A -----

cons

Anexo II

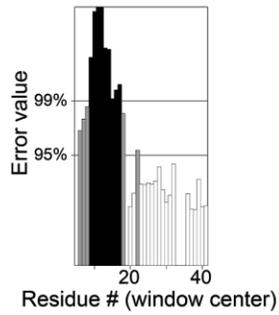
Cambios de energía, valores *ERRAT* y gráficos de Ramachandran antes y después de la minimización de energía a los ligandos hBD3, hBD6 y CCL2.

Los modelos antes de la minimización tienen como identificador su entrada en la PDB, después de la minimización se empleó su nombre común como identificador.

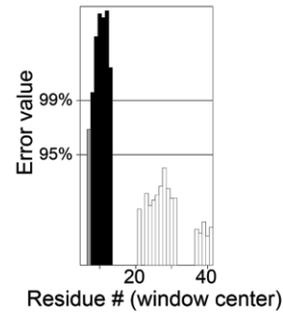


A)

1kj6
Overall quality factor: 56.250

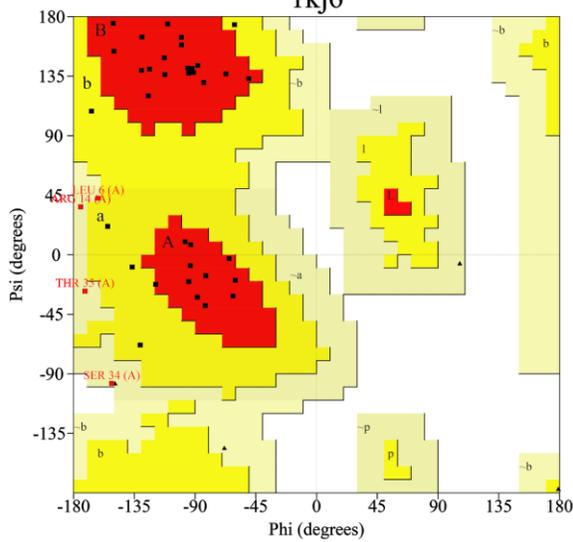


hBD3
Overall quality factor: 68.182



B)

Ramachandran Plot
1kj6

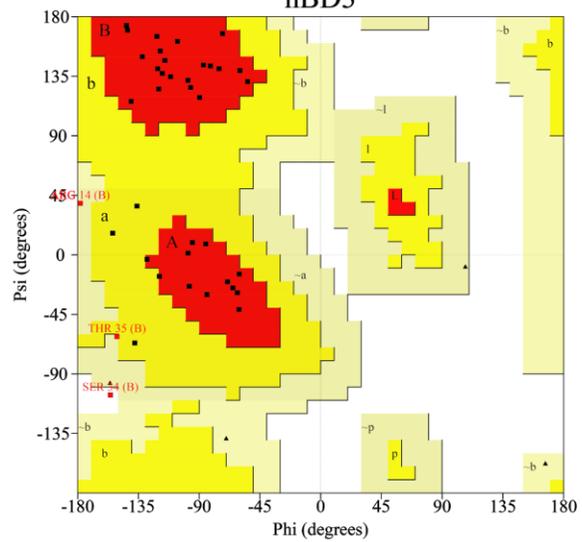


Plot statistics		
Residues in most favoured regions [A,B,L]	29	76.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	5	13.2%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	4	10.5%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	38	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	1	
Number of glycine residues (shown as triangles)	5	
Number of proline residues	1	

Total number of residues	45	

Ramachandran Plot
hBD3



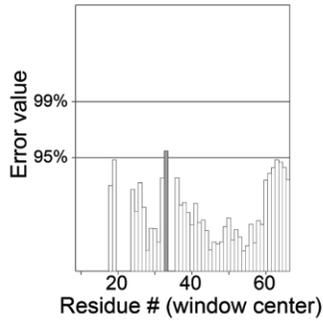
Plot statistics		
Residues in most favoured regions [A,B,L]	32	84.2%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	3	7.9%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	2	5.3%
Residues in disallowed regions	1	2.6%

Number of non-glycine and non-proline residues	38	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	1	
Number of glycine residues (shown as triangles)	5	
Number of proline residues	1	

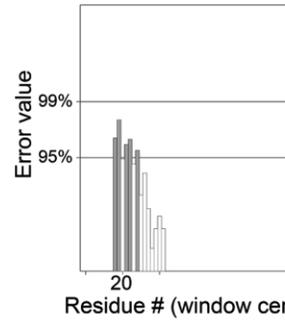
Total number of residues	45	

A)

3ifd
Overall quality factor: 97.674

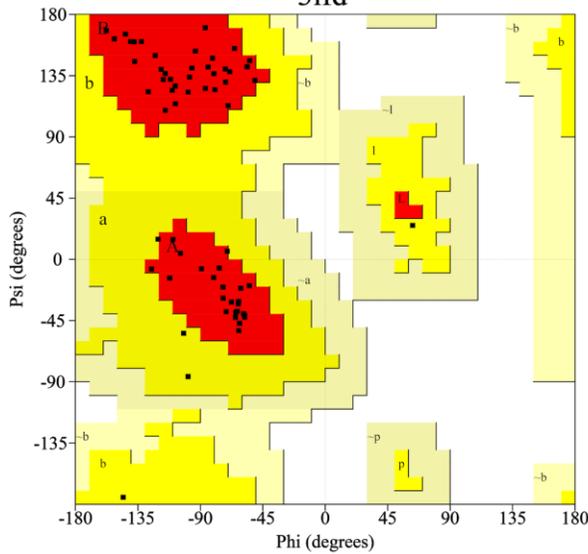


CCL2
Overall quality factor: 88.889



B)

Ramachandran Plot
3ifd

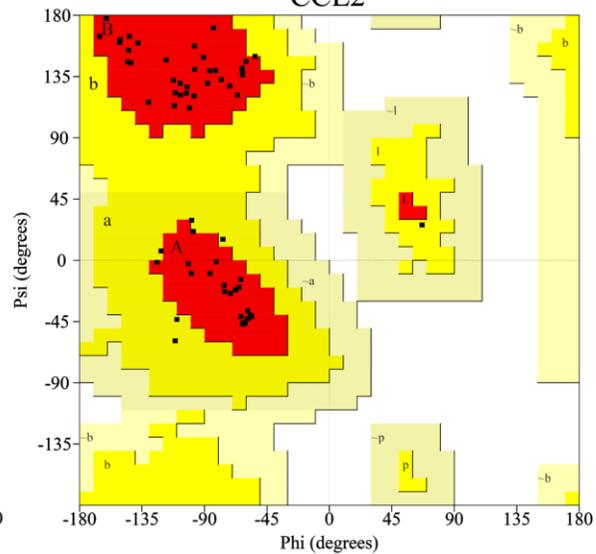


Plot statistics		
Residues in most favoured regions [A,B,L]	56	91.8%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	5	8.2%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	61	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	0	
Number of proline residues	3	

Total number of residues	66	

Ramachandran Plot
CCL2



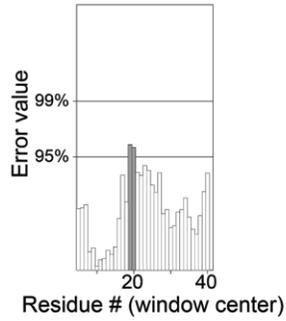
Plot statistics		
Residues in most favoured regions [A,B,L]	54	88.5%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	7	11.5%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	61	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	0	
Number of proline residues	3	

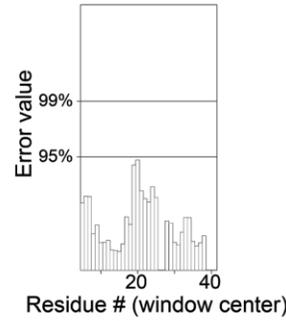
Total number of residues	66	

A)

2lwl
Overall quality factor: 94.444

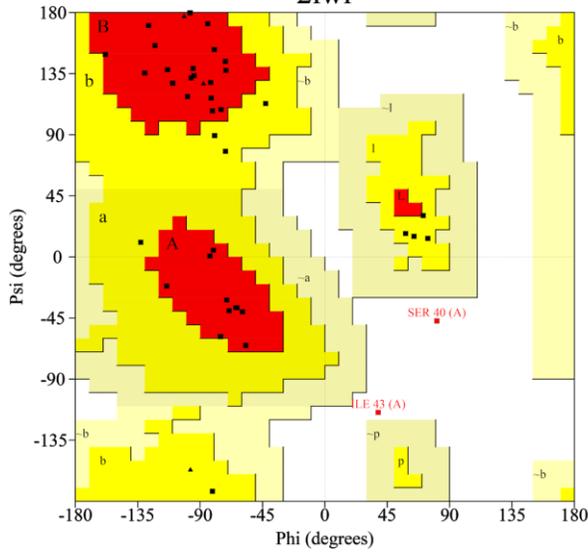


hBD6
Overall quality factor: 100.000



B)

Ramachandran Plot
2lwl

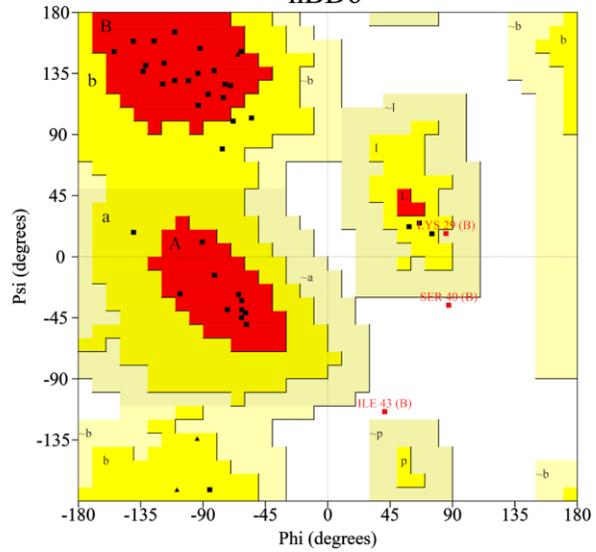


Plot statistics		
Residues in most favoured regions [A,B,L]	29	74.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	8	20.5%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	2	5.1%

Number of non-glycine and non-proline residues	39	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	3	
Number of proline residues	1	

Total number of residues	45	

Ramachandran Plot
hBD6



Plot statistics		
Residues in most favoured regions [A,B,L]	29	74.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	7	17.9%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	1	2.6%
Residues in disallowed regions	2	5.1%

Number of non-glycine and non-proline residues	39	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	3	
Number of proline residues	1	

Total number of residues	45	