

Interacción de linfocitos T CD4 con el segmento V3 de la glicoproteína 120 presente en el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1

Carrascoza F, Paz A,
Departamento de Citohistología

RESUMEN

La entrada del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) a un linfocito T_h CD4+ se inicia por la interacción del trímero viral gp160, el cual contiene en su extremo la glicoproteína gp120. Ésta interactúa directamente con el receptor CD4 del linfocito y posteriormente el complejo CD4-gp120 reacciona con un correceptor presente en los linfocitos T_h CD4+.

Esta investigación propone un mecanismo de reacción entre la glicoproteína gp120 en su segmento V3 al interactuar con el segundo segmento extracelular en el correceptor CCR5, para ello se han utilizado programas computacionales de enlace proteína-ligando para obtener detalles de las reacciones bioquímicas existentes entre estas regiones, con estos análisis se ha podido explicar la orientación CCR5-gp120 que forma este complejo. Además se ha diseñado un modelo molecular computacional que explica y es coherente con los resultados obtenidos entre esta investigación y las investigaciones previas. Los resultados encontrados muestran que existen regiones en el segmento V3 de gp120 que interactúan con el segundo segmento extracelular en CCR5, además de confirmar las regiones que interactúan en gp120 con los primeros 15 aminoácidos del correceptor CCR5. Esta propuesta explica mejor lo que ocurre en las cepas X5, X5/R4 y R4 de VIH que seleccionan entre diferentes correceptores (CXCR4 y CCR5 respectivamente) y sugiere que existen aminoácidos en V3 de gp120 cuya función es la orientación específica a un enlace estabilizado por todas las regiones de reacción entre gp120 de VIH-1 y el correceptor CCR5.

Introducción

En Guatemala, según los datos arrojados por el Ministerio de Salud Pública en 2007^{1,2} desde enero de 1984 hasta octubre de 2007 hay un total de 10,667 casos de infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) reportados, de los cuales 519 casos son transmisiones de madre a hijo. Este informe no reporta por falta de información, el porcentaje de personas que están vivas con VIH y por tanto tampoco reporta el número de defunciones a causa del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), en ninguna fecha.

Para poder encontrar la cura de una enfermedad, es necesario conocer su naturaleza. En cuanto a las investigaciones realizadas sobre VIH, que genera el SIDA, estas son muy abundantes, sin embargo no existen aun más que soluciones paliativas y propuestas de vacunas que apenas empiezan a ser desarrolladas y probadas.

Se conoce actualmente que el VIH-1 tiene un primer

contacto con el linfocito T_h CD4+ mediante gp160 que es un trímero proteico que conforma el extremo de los receptores del virus, en éste trímero se encuentra en la sección más externa gp120 que es la primera glicoproteína en entrar en contacto con CD4 que es el receptor principal del linfocito T_h CD4+^{3,4,5}.

Después de que gp120 se ha unido a CD4, el complejo gp120-CD4 debe unirse a otro correceptor, comúnmente CCR5 ó CXCR4, éste último lo utiliza el virus generalmente en la etapa tardía de la enfermedad, por lo que este estudio se enfoca en el contacto entre el correceptor CCR5 y gp120, donde gp120 utiliza una serie de segmentos que conforman el epítipo que ha de recibir al correceptor⁶.

En cuanto a las regiones específicas de CCR5 y gp120 que entran en contacto, se ha logrado mediante técnicas de cristalografía de rayos X^{tr}, obtener modelos computacionales moleculares y tridimensionales, los cuales han sido compilados en archivos de extensión .pdb, y posteriormente se

¹ Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (2007).

² Judith García Epidemióloga, FETP-GAP. (2007).

³ Navid Madani *et al* (2004)

⁴ Kwong P. *et al* (1998)

⁵ Madani N, Perdigo A. (2004)

⁶ Sophia Rits-Volloch, *et al* (2006)

analizan con programas computacionales de enlace proteína-ligando, para determinar las regiones específicas de interacción^{7,8}. En esta investigación, se ha buscado esclarecer dentro de estas regiones de interacción, los aminoácidos específicos que intervienen, para poder describir posteriormente un mecanismo de reacción que explique el comportamiento de dichas proteínas y consecuentemente el comportamiento inicial del virus al contactar con el linfocito receptor.

Para esclarecer estos mecanismos de reacción y reacción se han creado una serie de experimentos computacionales utilizando el programa Autodock 4.0, como método de enlace computacional automatizado, en donde además se han corroborado otros experimentos reproducidos con el mismo programa y con programas semejantes^{8,9}.

Materiales y Métodos

Universo de trabajo

Puesto que se trata de un estudio tipo meta – análisis, el universo de trabajo se conformó por toda aquella información acerca de la naturaleza inmunológica, bioquímica y química del VIH y su interacción con los linfocitos T CD4+. Por lo cual, los reportes, tesis, artículos científicos y bases de datos fueron discriminados con los criterios que se presentan en esta sección.

Los materiales y métodos utilizados en el estudio fueron los siguientes:

Materiales:

Investigaciones previas

Reportes, tesis, artículos científicos y bases de datos.

Hardware:

A- Procesador AMD Sempron 2800+ / 1000 Mb Ram / 256 Mb Nvidia GeForce FX 5500.

B- Procesador AMD Sempron 3400+ / 512 Mb Ram / 256 Mb Nvidia GeForce FX 5200 .

Software:

A-Linux Ubuntu 8.04 / Autodock 4.0 /Autodock Tools 4.01/Hex 5.0/UCFS Chimera 1.2540

B- Linux Slackware 12.01 /Autodock 4.0 / Autodock Tools 4.01/Hex 5.0/UCFS Chimera 1.2540

Métodos.

Criterios de inclusión y exclusión de artículos revisados:

Fueron seleccionados los artículos y la bibliografía según su importancia por:

Concepto: Caracterización estructural de aminoácidos relevantes (tanto de gp120 como de CD4 y los correceptores CXCR4 y CCR5).

Cronológico: Se priorizaron los estudios más recientes, puesto que el fin de esta investigación no es estadístico, se incluyeron artículos de 1981 a 1997 con un carácter histórico, en algunos casos algunos conceptos anteriores a 2000 continúan vigentes (ver descripción de CD4 y gp120 y la sección Conceptos básicos de inmunología).

Tabla No. 1

Cepa	(Posición Inicial) Secuencia (Posición Final)
JR-FL	(296)CTRPNNNTRKSIHI- -GPGRFYTTGEIIGDIRQAHC (331)
HXBc2	(296)CTRPNNNTRKRIRIQGPGRAFVTIGK-IGNMRQAHC (331)

Comparación entre las Cepas JRFL y HXBc2 en su región V3

⁷ Los experimentos mediante cristalografías de rayos X consisten en analizar un cristal del complejo CCR5-gp120-CD4 el cual es interpretado en un modelo virtual.

⁷ Shuqun Liu *et al* (2003)

⁸ Chih-chin Huang *et al* (2007)

⁹ Morris, G. M., *et al* (1998)

Según el tipo de información: Primaria (artículos que generan resultados con base en experimentos realizados por la misma institución (o grupo científico) que las analiza y reporta, en el caso de las secciones “Estudios previos sobre la estructura de gp120 y de CD4” se utilizaron bases de datos de reconocimiento internacional.

Fueron excluidas por tanto las investigaciones de tipo secundarias y terciarias: que son estudios realizados por aquellas instituciones o grupos que recopilan los análisis realizados por otras instituciones para presentarlos en compendios, resúmenes paráfrasis u otro tipo de interpretación que no sólo pueda alterar la información primaria, sino también que sesguen los resultados de laboratorio originalmente obtenidos.

No fue el objetivo de este estudio obtener información con fines de comparación estadística, a excepción del planteamiento de la estructura básica de gp120 donde se utilizaron bancos de datos como fundamento para encontrar factores comunes de expresión en los aminoácidos del segmento V3. También en el caso de los correceptores, para lo cual se utilizaron estudios que demostraron obtener las estructuras por sus propios procedimientos de laboratorio, por lo cual estas fuentes de datos fueron consultados en artículos científicos mundialmente reconocidos por la misma comunidad científica.

Se observaron según el caso, aquellas estructuras proporcionadas por artículos científicos que reportaron mutaciones, supresiones o pérdida de aminoácidos según la importancia que tengan dichas alteraciones para los segmentos estudiados en este trabajo.

Método de Análisis Estructural Químico

La elucidación de los mecanismos de reacción planteados se hizo por medio de programas computacionales de tres dimensiones que permitieron un análisis exacto con archivos de tipo banco de dato proteico pdb (protein data

bank), recopilados de la información brindada por los autores de artículos que generan estos archivos virtuales tridimensionales en base a estudios cristalográficos de rayos X, y que se encuentran recopiladas en bases de datos como la Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) que es un grupo respaldado por Rutgers el cual es el departamento RCSB de la Universidad de New Jersey, el grupo RCSB-SDSC que está localizado en el Centro de Supercomputadoras de San Diego (SDSC), la Skaggs School de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas (SSPPS) de la Universidad de California, San Diego (UCSD), y el grupo RCSB-BMRB que está localizado en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Wisconsin-Madison. También ha sido tomado en cuenta The World Wide Protein Data Bank que es el centro de depósito mundial de proceso y distribución de datos pdb, cuyo respaldo descansa en los grupos RCSB de Europa, Estados Unidos y Japón.

Los programas de estudio de estructuras biológicas macromoleculares utilizados para este estudio como Hex 5.0, Autodock y Chimera, fueron seleccionados por su reconocimiento en la exactitud de la descripción molecular en tres dimensiones de las nubes electrónicas que conforman cada uno de los átomos presentes en estas macromoléculas, esta descripción atómica está basada en la interpretación de algoritmos matemáticos que describen los orbitales moleculares mediante una malla electrónica virtual tridimensional, permitiendo predecir los cambios conformacionales del ligando y correceptor.

Procedimiento

1- Se seleccionaron los mejores archivos del complejo CD4-gp120 y de CCR5 en formato .pdb discriminados según los criterios previamente descritos.

Archivo 1OPW

La secuencia de HIV-1 utilizada fue la glicoproteína de cubierta gp120 cepa HXBc2 expresada en el archivo 1OPW.pdb extraído del sitio de internet de Proteín Data Bank. Este archivo muestra a gp120 en complejo con CD4 Humano y con CCR5 en el último estado del enlace CD4-gp120-CCR5. En este archivo no se ha publicado el segmento V3 de gp120 y CCR5 está unido a gp120 en una propuesta molecular teórica, cuyas coordenadas atómicas provienen de una evaluación por cristalografía de rayos X. En 1OPW.pdb las cadenas gp120 y CD4 fueron obtenidas del archivo 1G9M.pdb que presenta un complejo CD4-gp120-17B donde 17B es un anticuerpo monoclonal, y las coordenadas atómicas de este archivo han sido verificadas por medio de cristalografía de rayos X. Sin embargo 1OPW.pdb ha sido tratado según el mismo artículo de Liu S.Q. *et. al.*(2003) por simulación de movimiento molecular y enlace automatizado para representar este modelo teórico de enlace.

El tratamiento que se realizó en 1OPW.pdb consistió en eliminar la cadena de secuencia de CCR5 por medio del programa computacional Chimera, y se verificó posteriormente que no existieran partículas de agua o aminoácidos incoherentes en el complejo CD4-gp120 restante. Esto se hizo previo a la utilización de este complejo para correrlo en las secuencias de enlace computacional automatizado con el programa Autodock4.01.

Archivo CCR5

Para realizar las secuencias de enlace computacional automatizado se utilizó un segmento de CCR5, no CCR5 completo puesto que el programa Autodock 4.01 solamente permite el enlace un receptor-ligando donde el receptor puede ser cualquier macromolécula que no supere los 50,000 átomos, pero el ligando debe ser pequeño, con un máximo de 128 átomos; este máximo es extensible a cantidades mayores de

átomos con la consecuencia de cargar excesivamente los cálculos computacionales que un ordenador AMD 3400+ Mhz puede realizar. Este fue el motivo por lo cual se utilizó el archivo 2RLL.pdb que es una secuencia corta de CCR5 Nt (7-15) (los aminoácidos 7-15 de la región N terminal que eventualmente también se expresa como CCR5₇₋₁₅ o simplemente CCR5 7-15). Además, la secuencia CCR5 7-15 es la que previamente se ha descrito como la región de interacción más importante en el correceptor CCR5 junto a su región extra celular ECL2, región que se detalla a continuación.

Archivo ECL2

Para evaluar las interacciones energéticas entre el segundo segmento extracelular de CCR5 que es llamado ECL2, fueron extraídos los aminoácidos 169 al 180 de la cadena CCR5 presente en el archivo 1OPW.pdb descrito previamente. Para eliminar los posibles errores de evaluación energética, se le asignó movimiento torsional aleatorio tanto a la cadena peptídica como a las cadenas laterales de ECL2 en un proceso que será detallado más adelante.

Archivo 2B4C

2B4C.pdb es otra representación de anticuerpo monoclonal unido al complejo gp120-CD4. La secuencia utilizada de gp120 de VIH-1 en este archivo pertenece a la cepa JR-FL que es una de las más comunes junto a la cepa HXBc2, se seleccionó este archivo por ser el único que incluía por completo el segmento V3 y además, se encuentran en estado no enlazado. El propio archivo 2BC4 es una representación teórica del enlace a un anticuerpo monoclonal. Las regiones de interés no han sido alteradas significativamente como lo describe este mismo archivo. Para el segmento V3 a continuación se detalla la diferencia entre cada cepa (Ver Tabla No.1)

Este archivo fue seleccionado puesto que sus coordenadas fueron obtenidas directamente por

medio de difracción de rayos X en base a un cristal de complejo.

El tratamiento ejecutado a este archivo consistió en la eliminación de las cadenas H y L, siglas que representan las secuencias de las moléculas anti-VIH gp120 inmunoglobulinas X5 de cadena ligera y cadena pesada respectivamente, además fue eliminada la secuencia Het que comprende residuos proteicos presentes en el cristal analizado.

El nuevo archivo producto de este tratamiento fue nombrado gp120-CD4.pdb.

Archivo V3

El archivo gp120-CD4.pdb antes mencionado fue tomado y se sustrajo la sección V3, explícitamente los aminoácidos desde PRO299 hasta ARG327 de gp120 utilizando para ello el programa computacional Chimera, y fue guardado como V3.pdb.

2- Se establecieron los puntos críticos de reacción según los archivos .pdb seleccionados.

3- Se determinaron por métodos de enlace computacional proteína-ligando las regiones que intervienen entre gp120 y CCR5 con el fin de describir la estructura del complejo CCR5-gp120-CD4.

Dicha determinación se realizó adquiriendo y construyendo archivos pdb pequeños de CCR5 que reaccionaron como ligandos contra regiones específicas del enlace gp120-CD4, las cuales fueron preestablecidas por los datos que reporta la literatura.

Determinación de las Regiones de Reacción de CD4-gp120 y CCR5

Se realizó un total de ocho corridas por medio del programa computacional Autodock versión 4.01 para determinar por medio de varias comparaciones en las energías de enlace determinadas por el programa, los aminoácidos que producían los complejos receptor-ligando más estables en función de las mayores energías de enlace liberadas.

Parámetros Utilizados en Cada Corrida:

[Número de corridas en Algoritmo Genético: 100]

Tamaño de la población: 150 individuos Máximo

[Rango de mutaciones genéticas¹⁰: 0.02]

[Rango de traslapes: 0.8]

Modo de algoritmo genético de traslape: twopt

Número de generaciones de las cuales se escoge

el peor individuo: 10

Tabla No. 2: Comparación entre las Corridas 1 y 2

Propiedad	C1 R1/100	C1 R2/100	C2 R1/100	C2 R14/100
Energía de enlace	-3.77 Kcal/mol	-3.19 Kcal/mol	-2.95 Kcal/mol	-1.3 Kcal/mol
E. Intermolecular	-9.25 Kcal/mol	-6.14 Kcal/mol	-8.2 Kcal/mol	-5.7 Kcal/mol
Energía Interna	-11.42 Kcal/mol	-13.94 Kcal/mol	-6.09 Kcal/mol	-6.94 Kcal/mol
Energía Torsional	10.43 Kcal/mol	10.43 Kcal/mol	11.34 Kcal/mol	11.34 Kcal/mol
E. Ext. de No Enlace	-6.47 Kcal/mol	-6.47 Kcal/mol	0.0 Kcal/mol	0.0 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0	0.0	0.0	0.0
Ref RMS:	7.2	7.2	11.84	8.99

CxRy/100: Corrida x, Rango y de 100

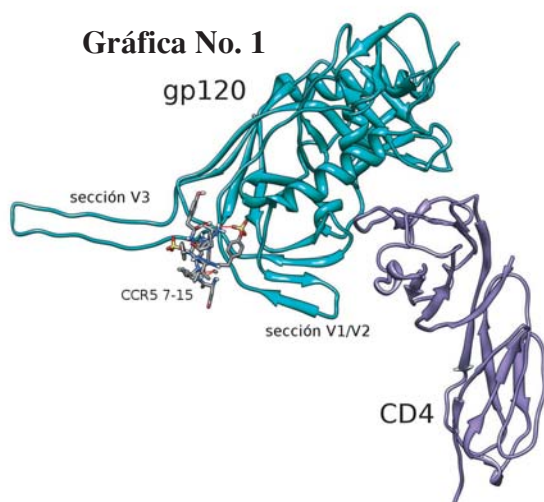
E. Ext. De No Enlace: Energía Extendida de No Enlace

RMS: Root Mean Square (Raíz Cuadrada Media).

– Algunas imágenes de gráfica molecular fueron producidas utilizando el programa UCSF Chimera package de el Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics de la University of California, San Francisco (soportado por NIH P41 RR-01081).

¹⁰ **Rango de mutación:** Es un punto flotante desde 0 a 1, representando la probabilidad de que un gen particular sea mutado. Este parámetro generalmente es pequeño.

Rango de Traslape: Este es un numero variable desde 0 hasta 1 denotando el rango de traslape. El rango de traslape es el número esperado de pares en la población que intercambiarán material genético. Corregir este valor a 0 torna el Algoritmo Genético en un método de programación evolucionaria (EP), pero EP puede requerir probablemente un incremento concomitante en el rango de mutaciones del algoritmo genético con el objeto de ser eficiente.



Esquema general del complejo gp120-CD4: vista panorámica de la posición del ligando respecto al complejo gp120-CD4 que se observa en diagrama tipo *Ribbon*¹, CCR5 se presenta en diagrama de líneas y barras

Número máximo de individuos que sobreviven por cada corrida: 1 [Número de Evaluaciones: 2.5 millones] Número Máximo de Generaciones: 27,000 Los parámetros electos referentes a la probabilidad de mutación genética son bajos, puesto que Autodock los utiliza en caso de trabajar con secuencias de ADN o ARN, en este caso se disminuye tal probabilidad para poderlo aplicar sin problemas a secuencias proteicas.

Para realizar el enlace automatizado, los segmentos pdb construidos o adquiridos fueron sometidos a una malla electrónica tridimensional donde se se ubicó el receptor gp120-CD4. Para este caso en particular se creó un segmento de CCR5 que es la región N-terminal que comprende los primeros aminoácidos 7-15 de CCR5 que se hicieron reaccionar contra las regiones V3 y contra las regiones V1/V2 presentes en el complejo gp120-CD4.

Otro segmento importante que fue creado es el de la segunda región extracelular conocida como ECL2 la cual ha sido descrita como importante por su interacción con gp120. Este segmento ECL2 también es sometido al proceso de enlace automatizado en las regiones V3, V1/V2.

4- Para conocer la orientación exacta de CCR5 respecto de gp120, los datos antes generados fueron comparados mediante las energías de enlace liberadas, que son calculadas por el mismo programa Autodock 4.01, es de esperar que las regiones más exitosas en el enlace posean las mayores liberaciones de energía y que por tanto se comportan más estables al poseer menor energía de enlace.

5- El nuevo complejo CCR5-gp120-CD4 adquirido por este método es sometido a un análisis estructural mediante los programas computacionales que permitieron medir la interacción de los aminoácidos del segmento V3 con CCR5 en los siguientes parámetros: distancia de enlace, campos energéticos, formación de puentes de hidrógeno, interacción de regiones polares, interacciones de Van der Waals.

6- Finalmente con esta información se obtuvieron conclusiones acerca del mecanismo de reacción sugerido para obtener este complejo CCR5-gp120-CD4.

RESULTADOS

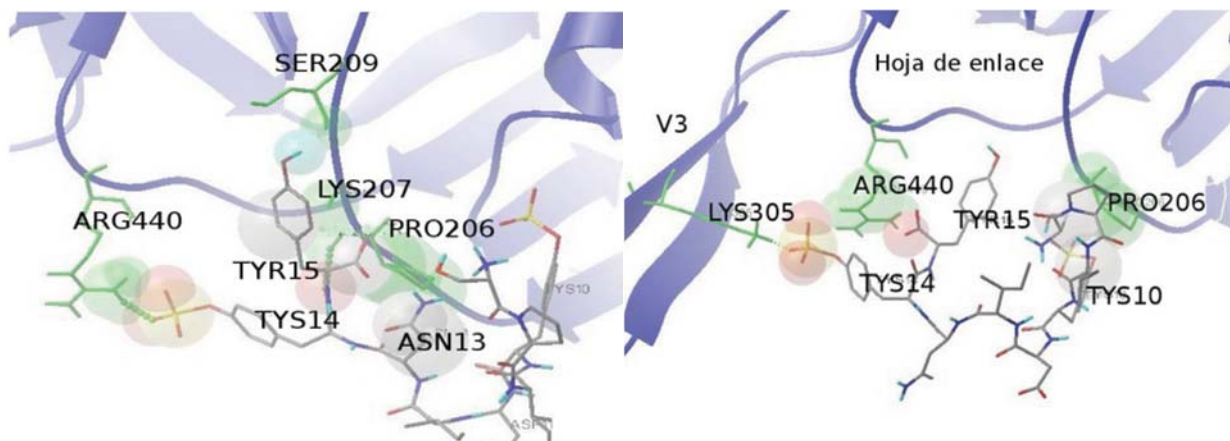
Se realizó un total de 8 corridas en donde cada una brinda 100 posibles soluciones, de estas 100 soluciones se extrajeron las mejores en base a:

- Mayor liberación de energía de enlace: que determina la estabilidad del complejo formado, además se analizó este parámetro en conjunto con otras energías que complementan este resultado.

- Lógica conformacional: en base a un análisis sobre la posibilidad que presenta determinada conformación de un aminoácido, de existir en la realidad.

- Lógica Posicional: Si la posición ligando-proteína es coherente con lo reportado por la literatura y en base a la situación mecánica celular.

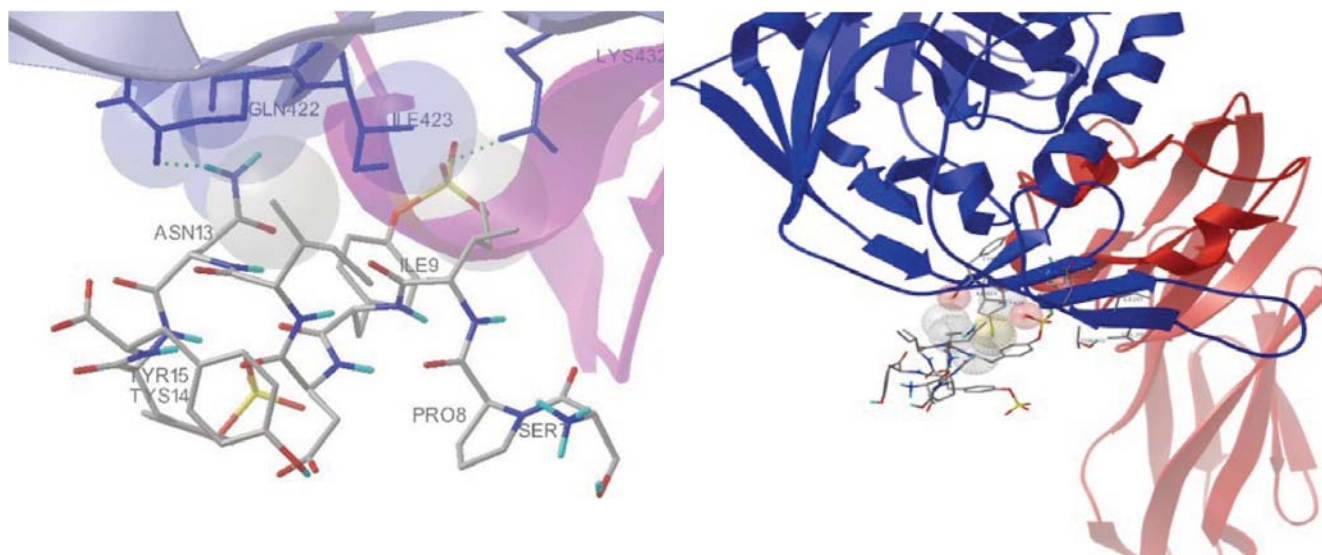
Gráfica No.2



Izquierda: Detalle de la conformación de la CORRIDA 1, Rango 1/100, se puede apreciar en detalle la conformación de CCR5 respecto a gp120, claramente se encuentra posicionado entre V3, la hoja de enlace y la sección V1/V2. Esta es conformación elegida por el programa como Rango 1/100 lo que se interpreta como la primera posición elegida por el programa en base a la energía de enlace más baja (-3.77 Kcal/mol), y ha sido descartada por encontrarse posicionada en medio de las tres regiones más reactivas de gp120. El análisis que condujo a tomar la conformación de rango 2/100 como conformación óptima para esta corrida se detalla en la sección Discusión de Resultados. Los puentes de hidrógeno son representados como puntos verdes, los aminoácidos que intervienen por parte de gp120 son de color verde, CCR5 está esquematizado como estructuras de líneas, gp120 fue esquematizado como estructura *Ribbon*, todas las interacciones atómicas intermoleculares han sido marcadas en esferas de colores, rojo-oxígeno, amarillo-azufre, azul-nitrógeno, gris-carbono.

Derecha: Detalle del enlace CCR5- 7-15 a gp120, Corrida 1, Rango 2/100. En el rango 2/100 ya no existe una interacción directa con el segmento V3, únicamente con ARG440 que pertenece a la hoja de enlace y la sección V1/V2 en los aminoácidos PRO206-SER209.

Gráfica No. 3



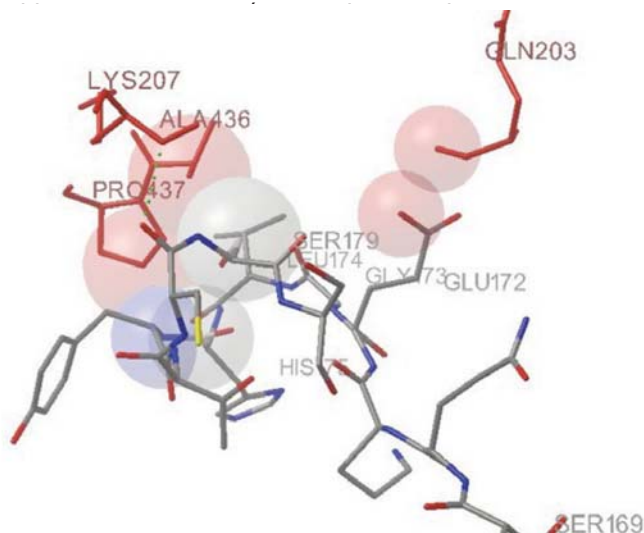
Izquierda: Interacción en Corrida 2 Rango 1/100. Es posible apreciar el contacto del GLN422 mediante puente de hidrógeno con ASN13, así como también el puente de hidrógeno existente entre TYR15 y ILE423 de la región de la hoja de enlace en gp120, estas interacciones son ayudadas por ILE9 en CCR5 y por LYS432 en gp120.

Derecha: Contexto de la Corrida 2 Rango 14/100. CD4 se observa en color rojo y esquema Ribbons, gp120 de VIH se representa en color azul y en esquema de *Ribbons*, y CCR5 1-15 está representado en estructura de líneas.

Tabla No. 3 Comparación entre las corridas 3, 4 y 5

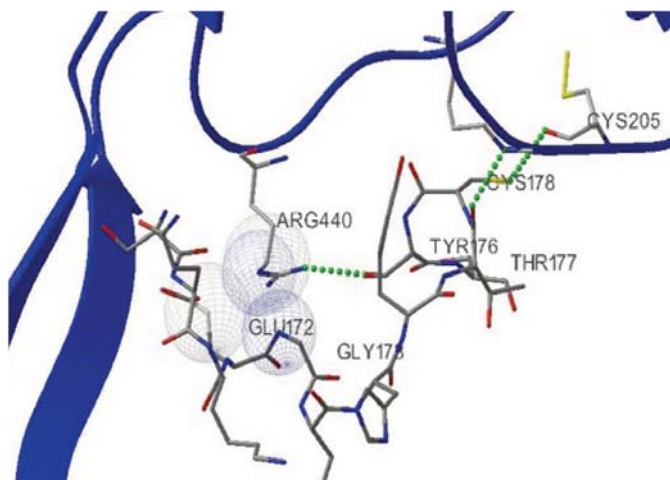
CxCy: corrida x, Rango y/100
todas las energías han sido medidas en Kcal/mol
RMS: Root Mean Square (Raíz Cuadrada Media)

Propiedad	C3R1	C4R1	C4R2	C4R3	C4R4	C4R8	C4R9	C5R1	C5R2
Energía Enlace	-1.47	-4.58	-4.22	-3.68	-3.57	-2.86	-2.83	-0.81	0.4
Energía Intermolecular	-6.74	-6.14	-7.96	-6.9	-5.48	-3.85	-3.65	-7.76	-6.81
Energía Interna	-7.86	-11.57	-9.39	-9.91	-11.22	-12.14	-12.3	-6.17	-6.27
Energía Torsional	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13	13.13
Energía Extendida de No Enlace	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cluster RMS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ref RMS	7.24	6.62	15.54	12.1	9.67	5.82	9.6	7.2	7.2



Gráfica No. 4

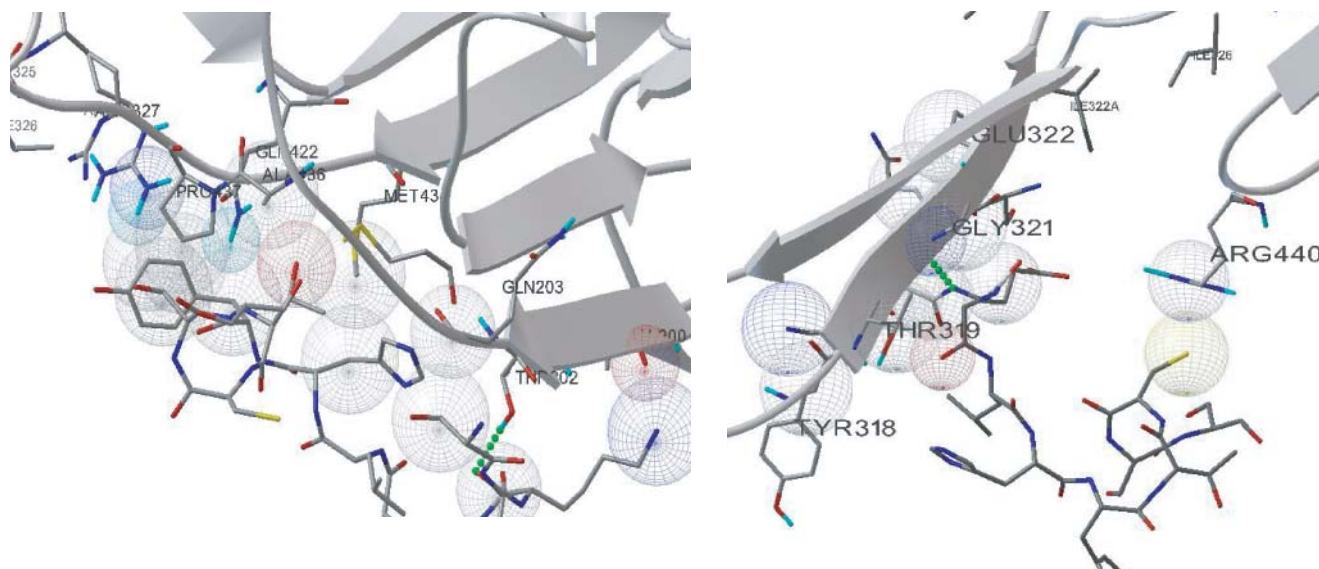
Detalle de Corrida 3 Rango 1/100: se observa que las interacciones más claras son de PRO437-SER179 (los aminoácidos en rojo pertenecen a gp120, el resto a CCR5); ALA436-LEU174, GLY173-GLN203.



Gráfica No. 5

Interacción en Corrida 4, Rango 1/100: gp120 se presenta en color azul y en esquema *Ribbons*, ECL2 se aprecia en estructura de líneas. Las interacciones principales de este conformero se observan en ARG440 que enlaza puentes de hidrógeno a TYR176, y a su vez con GLU172 en interacción electrostática de los grupos amino y carbonilo. Se forman dos puentes de hidrógeno entre las CYS178, TYR176 y CYS205. Esta conformación es la más estable en su relación de energía de enlace y es la propuesta por Autodock como la mejor solución. Se puede apreciar también una ruptura típica de la conformación de ECL2.

Gráfica No. 6



Izquierda: Interacción en Corrida 4, Rango 3/100: En esta conformación ECL2 también se encuentra distribuido a lo largo de sí y confirma la alta reactividad de las regiones de la hoja de enlace y la región V1/V2 lo que puede sugerir que esta región es de suma importancia para la orientación de ambas proteínas durante el mecanismo de enlace gp120-CCR5.

Derecha: Interacción en Corrida 4, Rango 4/100: Esta es una de las interacciones energéticas más baja que también muestra una concordancia con las propiedades físicas y mecánicas de ECL2 en cuanto a la conformación que se espera guarde este segmento. Se puede observar que CCR5 7-15 interactúa con la región media de V3 y con ARG440 de gp120 que es uno de los aminoácidos que ha destacado en la interacción con CCR5. Si embargo ECL2 se encuentra al revés respecto a su orientación con CCR5 en la interacción global gp120-CCR5. Gp120 ha sido representado en color gris y en estructuras *Ribbons*.

Gráfica No. 7

Gráfica No.7: Interacción en Corrida 5, Rango 2/100: En la imagen superior se observa la única interacción importante encontrada para la relación ECL2-V1/V2, en la imagen se puede observar que el contacto directo es pobre entre ambas secciones y la energía de enlace reportada para esta interacción (0.4 Kcal/mol) es positiva, por tanto endotérmica. gp120 ha sido descrito como estructura *Ribbons* gris y ECL2 como estructura de líneas.

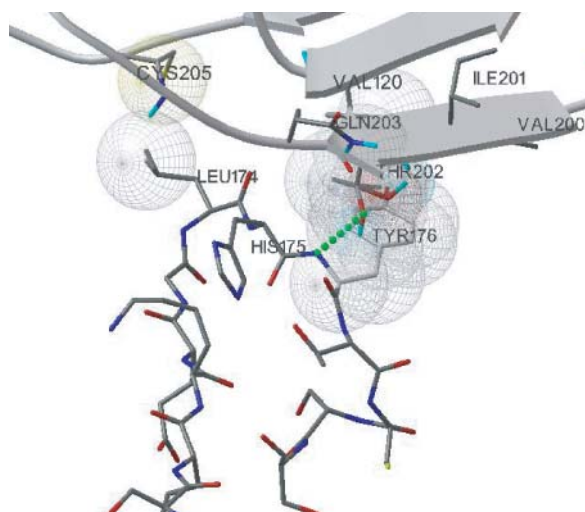


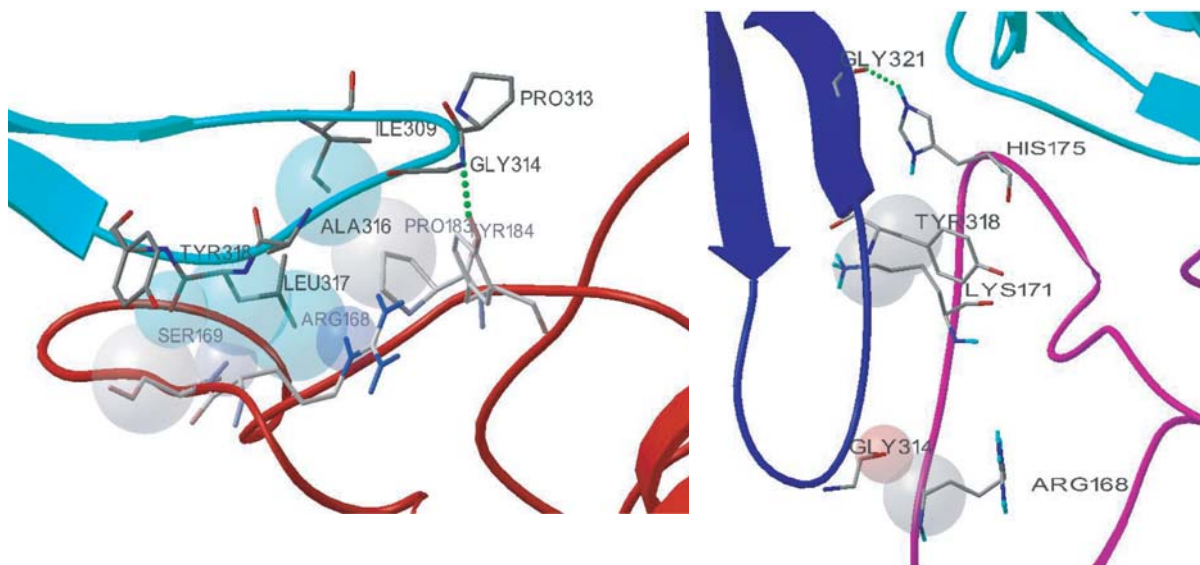
Tabla No.4: Comparación entre las Corridas 6 y 7

CxRy: Corrida X, Rango y/100

RMS: *Root Mean Square* (Raíz Cuadrada Media)

Propiedad	C6R1	C6R13	C6R14	C7R1	C7R13
Energía de enlace	11500000.0	11500000.0	11500000.0	22.12	22.43
Energía Intermolecular	-4.06	-3.04	-2.12	-7.16	-7.3
Energía Interna :	11500000.0	11500000.0	11500000.0	-0.4	-0.39
Energía Torsional :	30.13	30.13	30.13	30.13	30.13
E. Ext. de No Enlace	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cluster RMS:	0.0	0.0	0.0	0.0	0.88
Ref RMS:	28.64	28.64	25.88	16.46	16.38

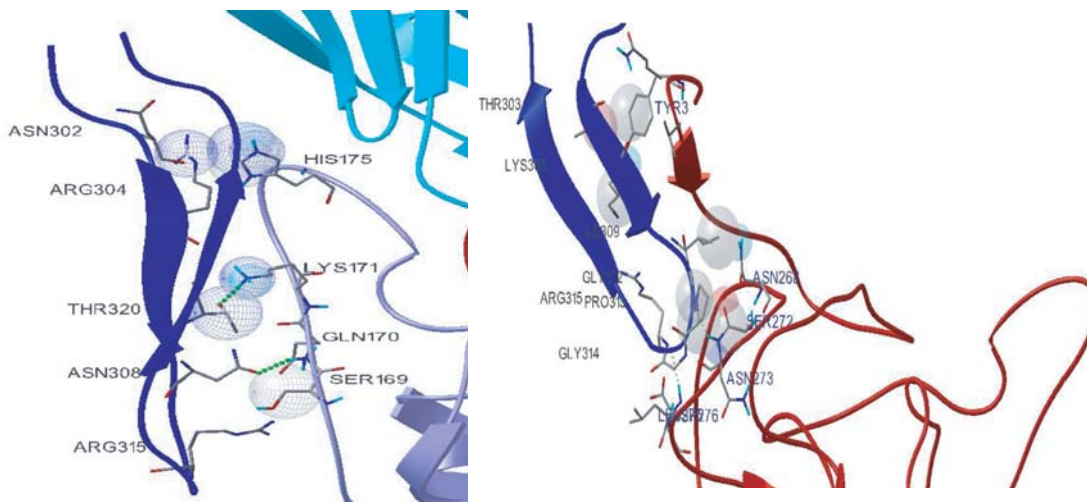
Gráfica No. 8



Izquierda: Interacción en Corrida 6, Rango 1/100: Puede observarse la interacción electa por el programa Autodock como la óptima tomando como referencia la energía intermolecular reportada para este enlace que es -4.06 Kcal/mol. El segmento V3 de gp120 se observa de color celeste y en esquema Ribbons, al igual que CCR5 que se presenta de color rojo. Los aminoácidos de ambas proteínas que entran en contacto han sido representadas en estructura de líneas. Es posible distinguir un puente de hidrógeno representado por puntos verdes entre GLY314 y TYR184, es importante hacer notar que la posición física en este modelo, no encaja con la descripción propuesta por Liu *et. al.* (2003) en el archivo IOPW.pdb.

Derecha: Interacción en Corrida 6, Rango 13/100: Esta es la primera interacción encontrada que posee un orden coherente con el esquema general propuesto. Se observa que está estabilizada por un puente de hidrógeno formado entre GLY321-HIS175, e interacciones entre TYR318-LYS171 e GLY314-ARG168. El segmento V3 se encuentra representado en color Azul, gp120 en celeste y CCR5 en fucsia. Los aminoácidos que interactúan están representados en esquemas de líneas y tanto V3 como CCR5 en esquema *Ribbons*.

Gráfica No. 9



Izquierda: Interacción en Corrida 6, Rango 14/100: Otra interacción no muy diferente en el estado energético intermolecular, pero presenta una mejor posición en contexto de V3 en relación con CCR5 y gp120. Aquí las interacciones importantes están descritas por ASN302, ARG304-HIS175, THR320-LYS171, ASN308-GLN170 y por ARG315-SER169. El segmento V3 de gp120 se presenta de color Azul, CCR5 de color morado, gp120 de color celeste y al fondo puede apreciarse CD4 en color rojo. Todas las proteínas se encuentran en esquemas *Ribbons* y los aminoácidos que interactúan en esquemas de líneas.

Derecha: Detalle en la Interacción de la Corrida 7, Rango 3/100: un acercamiento de esta interacción revela los aminoácidos importantes en la estabilización de este complejo, entre los aminoácidos que interactúan se puede distinguir: ILE309, LYS305-TYR3; GLY314-LYS276, PRO313-ASN273, GLN312-SER272, ASN266.

Gráfica No. 10

Detalle de la Interacción en Corrida 8, Rango 1/100: se aprecia un acercamiento de la mejor interacción en esta corrida. Los enlaces destacados son descritos a continuación: GLU172-ASN300, GLY173-THR303, LEU174 mediante puente de hidrógeno a ARG304, TYR176-SER306, ILE307. El segmento V3 de gp120 ha sido ilustrado en color azul y en esquema *Ribbons*, el segmento ECL2 de CCR5 ha sido descrito en color gris y también en esquema *Ribbons*. Las interacciones han sido señaladas con esferas y los puentes de hidrógeno con líneas punteadas verdes.

La gráfica representa la situación teórica de la mejor conformación de enlace entre el segmento ECL2 del receptor CCR5 y el segmento V3 de gp120, la mayoría de las mejores conformaciones de las 200 evaluaciones hechas a este segmento apoyan esta conformación que a pesar de poseer una energía de enlace positiva (5.97 Kcal/mol) se encuentra en un contexto bastante lógico respecto a las propuestas de la conformación post enlace hasta ahora desarrolladas como en el caso de Liu *et al.* (2003). V3 Se representa en color azul y en esquema *Ribbons* mientras que ECL2 se presenta en color lila y en esquema *Ribbons* también. Los choques intermoleculares se señalan con esferas, y los puentes de hidrógeno con líneas punteadas verdes.

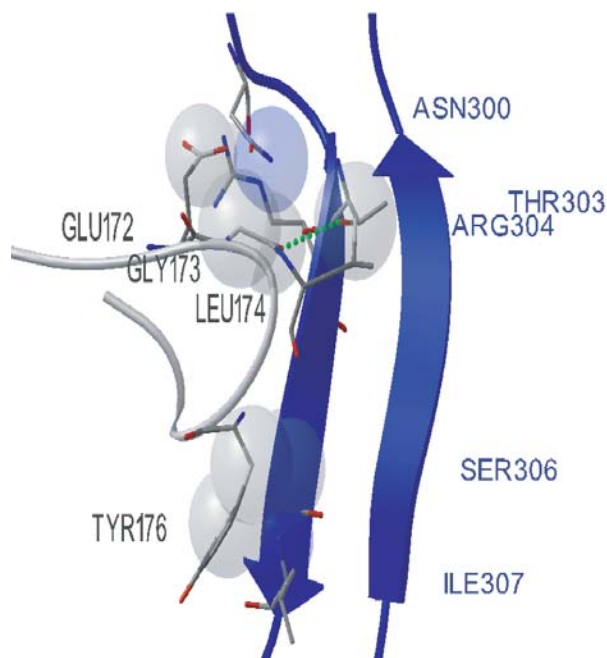


Tabla No. 5

Comparación entre las corridas relacionadas con la interacción entre ECL2 de CCR5 y V3 de gp120

RMS: Root Mean Square (Raíz Cuadrada Media)

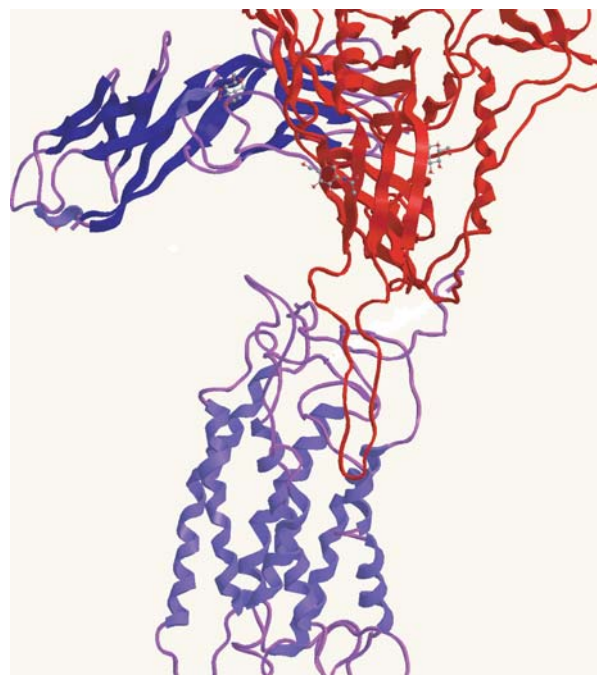
Todas las energías han sido estimadas en Kcal/mol.

E. Ext de No Enlace: energía extendida de no enlace.

Propiedad	C8R1	C7R3	C6R13	C6R14	C4R4/100	C4R9/100
Energía de enlace	5.97	22.43	11500000.0	11500000.0	-3.57	-2.83
Energía Intermolecular	-7.15	-7.3	-3.04	-2.12	-5.48	-3.65
Energía Interna :	0.0	-0.39	11500000.0	11500000.0	-11.22	-12.3
Energía Torsional :	13.13	30.13	30.13	30.13	13.13	13.13
E. Ext de No Enlace	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cluster RMS:	0.0	0.88	0.0	0.0	0.0	0.0
Ref RMS:	20.2	16.38	28.64	25.88	9.67	9.6

Gráfica No. 11

Vistas laterales de la unión propuesta entre gp120 de VIH-1 al correceptor CCR5. Es posible observar que la conformación del segmento V3 ha cambiado, que el segmento N-terminal de CCR5 está enlazado a la región V1/V1 cercana a la hoja de enlace en gp120, y que en el caso del segundo segmento extracelular el enlace ha ocurrido a través de los aminoácidos 304-320 de la región V3 en gp120.



Para recrear el contexto en el que se encuentra el complejo gp120-CD4 previo al enlace del correceptor CCR5 se realizaron una serie de mediciones llamadas “Corridas” cuyos resultados se interpretan a continuación.

Corrida 1 y Corrida 2

En estas corridas se evaluó la interacción de CCR5 (aminoácidos del 7-15) con las áreas de gp120-CD4 descritas como reactivas, las gráficas 2 y 3 muestran las mejores conformaciones encontradas para esta corrida. En la gráfica 2 se observa que CCR5 7-15 se ha enlazado en medio de las tres regiones más activas de gp120, donde sobresale TYS14 que forma un puente de hidrógeno con LYS305 que está en la región V3, lo cual provoca la expansión del ligando desde V1/V2 hasta V3. Se observa en la tabla No.2 que C1R1 es quien libera más energía de enlace (-3.77Kcal/mol) y quien posee también mejor liberación de energía intermolecular (-9.25 Kcal/mol), seguido por C2R1 con -8.2 Kcal/mol de energía intermolecular, ambas corridas No. 1 necesitan menos energía para realizar una torsión (10.43 Kcal/mol).

Si la posición de enlace de los aminoácidos 7-15 en la región N-terminal de CCR5 es la que indica la Corrida 1, Rango 1, entonces sería necesario plantearse la situación en la que debería de entrar el segundo segmento extracelular de CCR5 para contactar con el segmento V3 de gp120, ya que como se observa en la Corrida No.8 las mejores posiciones reactivas de ECL2 en CCR5 contra V3 en gp120 se encuentran en la misma región que en la Corrida 1 Rango 1, en otras palabras, CCR5 7-15 desplazaría por impedimento estérico a ECL2 en CCR5, lo cual sería posible si la energía global de enlace fuera menor, pero los enlaces de ECL2 de CCR5 a otras regiones de V3 en gp120 como la cresta de V3 por ejemplo, aumentan hasta 3 y 4

veces su valor de energía de enlace como se observa en las corridas posteriores.

La Corrida 2 ha desplegado una serie de interacciones donde la mayoría de las mejores soluciones se basan en un contacto de CCR5 7-15 con las posiciones aminoacídicas 322-432 en gp120, y todas estas interacciones son finalmente menos favorecidas energéticamente (en lo que a energía de enlace se refiere) que las interacciones desplegadas en la Corrida 1.

C1R2 es una solución notable en la que se establecen interacciones entre TYR15-LYS205, TYS14-PRO306 y ASN13 que permanece estabilizando a la relación TYS14-PRO206, resultado que es coherente por lo reportado Liu S.Q. *et.al.* (2003).

Este resultado de C1R1, donde se establece la interacción de CCR5 7-15 cercana a V3, también puede ser comparado con los resultados reportados por Chin-Chin Huang, quien apoya el hecho de que CCR5 7-14 interactúa plenamente con V3 y su base, siendo fuertemente atraído CCR5 7-15 por la región de la hoja de enlace y sin tener una interacción significativa con el sistema V1/V2.

En cambio, el estudio de Liu S. Q. *et.al.* (2003) en su experimento de modelaje molecular teórico establece que el segmento CCR5 7-15 interactúa en pleno con el sistema V1/V2 y es fuertemente atraído por la hoja de enlace, pero permanece CCR5 completo en un contexto que explica también la interacción que CCR5 tiene con gp120, en este archivo 1OPW.pdb la interacción del segmento ECL2 de CCR5 con V3 no es propuesta pero sí sugiere su orientación.

Basándose en los reportes anteriores y tomando en cuenta los resultados obtenidos en la presente evaluación, se puede inferir lo siguiente:

1- que definitivamente la región de la hoja de enlace ejerce una atracción muy fuerte sobre CCR5 7-15.

2- que la sección V1/V2 atrae a CCR5 7-15 y es capaz de orientar y muy probablemente es capaz de formar un complejo estable V1/V2 y hoja de enlace con CCR5 7-15, siempre y cuando guarde una lógica conformacional y energética con todo el correceptor CCR5.

3- En cuanto al segmento V3, se sugiere que podría actuar como un orientador, puesto que LYS305 forma un importante puente de hidrógeno con TYS14 de CCR5, pero para afirmar dicha interacción es necesario observar primero el comportamiento de la segunda región extracelular de CCR5.

4- El papel de ARG440 en la hoja puente es sumamente importante para la atracción del correceptor y probablemente para su enlace también, el problema en el análisis al rededor de ARG440 es que es una arginina tan activa que atrae por igual a ECL2 como se verá mas adelante, lo que hace necesario utilizar más datos para concluir certeramente cual es su interacción formal.

Es importante hacer notar que aunque el segmento N-terminal 7-15 de CCR5 no interactúa directamente con V3 e incluso con la hoja puente, el simple acercamiento de CCR5 7-15 a esta región puede tener la energía potencial necesaria para activar las conformaciones necesarias en el segmento V3 y en la hoja de enlace, lo cual prepararía a estas regiones para interactuar con cualquier otra región en CCR5.

Corridas 3, 4 y 5

En estas corridas se evaluó la interacción de ECL2 con todas las regiones activas gp120 concernientes a CCR5, la diferencia entre estas corridas fue el nivel de torsiones y grados de libertad en la rotación de los enlaces en ECL2. En la Corrida 3 no se permitió torsiones aleatorias significativas.

En la Corrida 4 si se permitió las torsiones de la cadena peptídica para analizar a fondo la función de los aminoácidos del segundo segmento extracelular de CCR5 que son descritos junto a los aminoácidos de la región N-terminal como los más importantes en CCR5 para su interacción con gp120. En la Corrida 5 la cadena peptídica de ECL2 permaneció fija mientras que a las cadenas R laterales se les otorgó torsiones flexibles y además se observó su interacción específica con la hoja de enlace y con el segmento V1/V2 de gp120. Los resultados obtenidos son analizados a continuación:

La tabla No.3 es una comparación de datos donde C3R1 pertenece a una interacción de gp120 con un ECL2 rígido mientras que los demás datos C4 pertenecen a un ECL2 flexible en su cadena peptídica y los datos C5 a una interacción de ECL2 flexibles en su cadena lateral R.

C4R1 se ha distribuido entre las tres regiones más reactivas de gp120 (hoja de enlace, V3 y V1/V2) mostrando dos puentes disulfuro entre CYS178 de ECL2 y CYS205 de gp120, además de un puente de hidrógeno importante entre ARG440 y TYR176, teniendo invadida la región V3 por impedimento estérico, lo importante de esta corrida es observar la estabilidad del enlace adquirido por la formación de los enlaces antes mencionados, siendo de importancia para ECL2 CYS178 y TYR176.

En el caso de C4R3 es interesante observar el posicionamiento que alcanza nuevamente CYS178 con CYS205, en donde a pesar de que según la gráfica No.6 Izquierda, no se reporta una interacción directa entre estos aminoácidos, estos quedan bien orientados. Además solamente se han aplicado movimientos torsionales a las cadenas peptídicas de ECL2 y no a sus cadenas R laterales, lo cual implica que en una interacción real es probable el contacto directo entre estas cisteínas.

[†]Dato no presentado en tablas, fue calculado por el programa Autodock 4.0

En cuanto a C4R4 es posible observar nuevamente el papel que desarrolla CYS178 sobre ARG440, aminoácidos que presentan un contacto distante que contribuye a la estabilidad del confórmero, luego es posible distinguir interacciones importantes en la región de aminoácidos GLN170, LYS171, GLU172, GLY173 con la región de V3 TYR318, THR319, GLY321, GLU322, donde además se guarda en ECL2 una conformación arqueada semejante a la presente en ECL2 en estado nativo, lo cual realza su importancia como posible solución a la interacción real entre ECL2 y V3.

C4R8 fue escogida por su conformación arqueada que es muy similar a la presente en ECL2 en su estado nativo, es aún más semejante que su homóloga C4R4 discutida previamente, de hecho la posición en la que se presenta respecto a gp120 es como la que se esperaría que tuviera en una interacción real, e interactúa directamente con la región V1/V2 de gp120, sin embargo su energía de enlace es la menor de todas las presentadas en esta serie de la Corrida 4, y su energía interna (-6.13 Kcal/mol^{tr}) es una de las más estables de todas las conformaciones presentadas lo cual es interpretable como una confirmación de la estabilidad de la conformación nativa.

C5R1 posee una de las energías de enlace más bajas dentro de este grupo de comparaciones, los datos aportados por C5R1 y C5R2 apuntan al hecho de que definitivamente el segundo segmento extracelular ECL2 de CCR5 no tiene una interacción real con el segmento V1/V2 de gp120 lo cual crea una concordancia con el trabajo presentado por Liu S. Q. Y sus colaboradores en 2003⁶.

Únicamente es necesario recalcar en esta corrida que C5R1 y C5R2 tienen ligandos ECL2 con cadenas peptídicas rígidas lo cual presenta cierta desventaja en este modelo de enlace teórico

respecto a una interacción real, aunque en tal caso, la Corrida 4 demostró ampliamente que de igual manera el área de V1/V2 era de bajo interés para la sección ECL2 de CCR5.

En un resumen de las corridas 3,4 y 5 se puede decir que las conformaciones C4R4 y C4R9 sobresalen demostrando que a pesar de la absoluta movilidad de la cadena peptídica concebida a ECL2, las más bajas energías conformacionales de este ligando calzan con la conformación del estado nativo de ECL2 y en interacción con V3, hecho que es de suma importancia. Otras energías de enlace más bajas han sido obtenidas en las regiones V1/V2 y la hoja de enlace, pero sin una conformación estructural lógica en ECL2, y en las corridas C3R1 donde la conformación de ECL2 no varía, se han reportado energías de enlace menores a -1.41 Kcal/mol.

Por otro lado la Corrida 5 sirvió para constatar la baja competitividad que presenta el segmento ECL2 en una interacción directa con V1/V2 tomando en cuenta que se trata de un modelo de enlace teórico.

Corridas 6 y 7

Las Corridas 6 y 7 estuvieron orientadas a encontrar interacciones específicas entre las regiones activas de CCR5 y el segmento V3, para lo cual se tomó únicamente este segmento de gp120 y se hizo enlazar a las dos regiones extracelulares más importantes de CCR5, la región N-terminal y ECL2, con lo cual se busca en primer lugar confirmar las soluciones obtenidas en las corridas anteriores, y en segundo lugar poder realizar una interacción directa de V3 en un modelo ideal libre de cualquier impedimento estérico que pueda provocar la conformación nativa o no nativa de gp120. En la Corrida 6 la energía de enlace y la energía interna de todas las soluciones fue 11500000.0, dato que es

incoherente por lo cual se descarta, el motivo que pudo ocasionar este error es una mala posición de la malla electrónica, lo cual obligaría a que durante las interacciones el ligando topara con la malla, circunstancia en la cual, estos datos pueden encontrar una explicación. Sin embargo es posible evaluar las comparaciones mediante la energía intermolecular desplegada, en tal caso, la Corrida 6 rango 1 es la solución energética más favorable, pero su posición física está fuera de contexto respecto a la interacción propuesta previamente por Liu S. Q. *et. al.* 2003. (Observar la Gráfica No.8 Izquierda).

En C6R13 se puede observar que la interacción se encuentra localizada hacia la parte media de V3 principalmente por los aminoácidos GLY 321, TYR 318 y GLY314 que reaccionan con los aminoácidos de CCR5 HIS175, LIS171, ARG168. Esta es la primera interacción coherente en el contexto del complejo CCR5-gp120-CD4 encontrada en la Corrida 6 y es necesario recalcar que se encuentra en la posición 13 en relación a la energía interna, lo que hace necesario realizar más análisis para corroborar este dato. Los datos de la Corrida 6 por tanto deben ser analizados en conjunto con la corrida 8 en la cual se tomó únicamente a los segmentos V3 de gp120 y ECL2 de CCR5 en una interacción ideal que utilizó a V3 como ligando y a ECL2 como receptor (ver el análisis de la corrida 8).

En C6R14 la interacción es sumamente semejante a la desplegada en C6R13, donde resalta el hecho de que a pesar de que hay una mayor interacción entre V3 y ECL2, disminuye la cantidad de energía intermolecular liberada siendo de -2.12 Kcal/mol en comparación a -3.04 Kcal/mol desplegadas por C6R13. Las interacciones en C6R14 son: ARG304 - HIS175; ILE323-HIS175, GLU322-HIS175, THR320-LYS171, ASN308-GLN170 (Observar la Gráfica No.9 Izquierda).

En cuanto a la corrida 7, las soluciones tomadas C7R1 y C7R3 ayudaron a entender los resultados encontrados por Chin-Chin Huan *et.al.* (2005), en los que se establece una interacción entre CCR5 7-15 y el segmento V3.

C7R1 es en efecto la conformación mejor favorecida en cuanto a energía de enlace, pero al analizar la posición de V3 en contexto con CCR5 se observa que V3 se interna en la región de membrana de CCR5 lo cual no debe suceder, y además la región N-terminal de CCR5 se incrustaría en el núcleo de gp120 lo cual no ha sido reportado.

C7R3 establece una solución interesante en la que V3 no solamente interacciona con el segmento N-terminal de CCR5 sino también con el primer segmento extracelular, en una región que esta muy cerca de la propia región intracelular de CCR5 pero no en ella. Esta solución despliega una energía de enlace de 22.43 Kcal/mol lo cual es un nivel de energía considerable en comparación a las corridas anteriormente evaluadas, e implica que el ligando y el correceptor deben absorber esta energía para formar los enlaces y puentes de hidrógeno referentes a su interacción, lo cual es posible dentro del medio celular, pero no es favorable energéticamente, este punto es de ser tomado en cuenta durante la evaluación de la Corrida 8 antes de albergar una conclusión. Las interacciones que se observan en la Gráfica No.9 Derecha son THR303,LYS305, ILE309 – TYR3; GLY314- LEU277; ARG315-SER272, ASN278; PRO313-ASN273.

Corrida 8

En la corrida número 8 fue evaluado el papel de ECL2 al interaccionar con V3 en un modelo teórico ideal, lo cual significa que no se han tomado en cuenta ninguna de las otras secciones de ambas proteínas, únicamente se trata de

esclarecer el papel específico de V3 en ECL2 de CCR5, para lo cual se diseñaron dos mallas electrónicas que cubrieron por completo a V3 que fue el receptor de la interacción, mientras que ECL2 permaneció como ligando.

El resultado de ambas mallas fue el mismo, por lo que 200 interacciones se pueden resumir a una representativa, lo cual fortalece dicha respuesta, y es presentada en la gráfica No.10.

La tabla de energías relacionadas a C8R1 muestra una energía de enlace de 5.97 Kcal/mol, que es considerablemente más baja que las 22.43 Kcal/mol requeridas en C7R13 o C7R1, sin embargo, las circunstancias de interacción no son las mismas puesto que en las otras corridas si se encuentran por completo al menos una de las proteínas que intervienen, por lo que conviene hacer un resumen comparativo de las interacciones de otras corridas semejantes a la Corrida 8:

Diferencias entre las corridas que se presentan en la Tabla No.5:

C4: ECL2 es flexible en cadena peptídica y se presenta contra gp120 completo

C6: V3 rígido contra ECL2 en CCR5 completo y rígido también

C7: V3 rígido contra N-terminal en CCR5 completo y rígido también.

C8: V3 rígido contra ECL2 en un modelo teórico ideal.

En la Tabla No.5, la Corrida 7 demuestra fácilmente que posee una desventaja energética respecto a las demás corridas en la tabla. Incluso la comparación entre la Corrida 7 rango 3 contra las dos Corridas 6 Rangos 13 y 14 aventajan a la Corrida 7 en cuanto a la Energía Intermolecular desplegada (por una diferencia de 4 y 5 Kcal/mol) lo que deja en claro que el segmento N-terminal en CCR5 es desplazado en la competencia de enlace de las dos regiones de CCR5 por V3 de gp120

en función de la formación de un complejo energéticamente estable.

En una comparación entre las Corridas 6 y 8 se puede obtener datos para aclarar los puntos exactos en los que reaccionan la región V3 de gp120 con ECL2 en el correceptor CCR5, apoyándose también en los datos que aporta la Corrida 4 que deben de describir los detalles mínimos de las conformaciones que se deben de alcanzar en ambas regiones. C6 y C8 deben ser coherentes en la interpretación de esta conformación. La conformación más favorecida energéticamente de estas interacciones es C8R1 cuyas interacciones en las posiciones 300-307 de la región V3 se dan con los aminoácidos 172-176 de ECL2, lo cual es muy semejante a la interacción que muestra C6R14 con enlaces entre las posiciones 302, 304 y 308 en V3 que entra en contacto con las posiciones 169, 170, 171 y 175 de ECL2, lo cual indica que la región media de V3 dominada por los aminoácidos 300-308 es la encargada de realizar una interacción específica y muy probablemente los aminoácidos 314 y 315 que se encuentran en la cresta del segmento V3 sean los encargados de la orientación primaria durante el enlace del segmento V3 a al segmento ECL2 asumiendo que exista un enlace posterior formal. Lo cierto es que la regla 11/25 establece un reconocimiento entre cepas X4 y R5 y sus respectivos correceptores.

11/25 se refiere a las posiciones 306 y 322 en V3 de gp120 en el archivo CD4-gp120 (las posiciones variarán según la cepa de VIH utilizada) y establece que si estas posiciones están cargadas positivamente, el virus usará el correceptor CXCR4; en cualquier otra combinación utilizará el correceptor CCR5 (Chin-Chin Huang). Ambas posiciones (306 y 322) se encuentran en la región media de V3 que ha sido determinada como epítipo de reacción por C6R14,

en los rangos de la Corrida 6 no se detalla tal interacción exactamente, pero es necesario recordar que ambas cadenas laterales R en la Corrida 6 permanecieron rígidas. Un análisis gráfico de las interacciones de Van der Waals de ambas cadenas demuestra que en efecto, en la corrida 6, rangos 13 y 14 no existe una interacción en los aminoácidos de posición exacta 306 y 322, pero sí hay interacciones para C6R1 en 309/318; para C6R13 en 314, 321 y para R6C14 304, 308, 320 y 323. Una razón probable de esta inexactitud es la rigidez conformacional a la que están limitadas las interacciones en el programa Autodock 4.

En C8R1 si existe una interacción directa de SER306 con ECL2, C8R1 tiene una interacción con V3 muy completa, lo cual debe ayudar a la gran estabilidad en la que resulta su energía de enlace.

Tampoco se descarta la posibilidad de que las posiciones 306 y 322 en el segmento V3 orienten al segmento ECL2 de CCR5 durante el proceso de enlace sin la obligatoriedad de que exista una interacción específica en el complejo final, pues al parecer otros aminoácidos como los presentes en la cresta del segmento ECL2 tienen una función de orientación también antes que de enlace, y hay que recordar que precisamente los aminoácidos que se encuentran en la cresta del segmento V3 (la secuencia PGRAFY) son los más invariables de esta región variable.

En resumen para la Corrida 8, se puede describir a la secuencia de aminoácidos 300-308 en la región V3 de gp120 como los responsables de la interacción directa con la región ECL2 presente en CCR5, lo cual permite interpretar también que deben existir en la región V3 otros aminoácidos cuya función es orientar al segmento ECL2 durante el proceso de enlace. Además es necesario observar que es posible la formación de más de

un tipo de enlace en V3 dada la alta reactividad que presenta esta región esencialmente en las posiciones ya mencionadas 300-308, pero además en las regiones 317-324 la cual es una región altamente flexible.

Por otra parte lo anterior implica que la región N-terminal debe ser la encargada de reaccionar directamente con las regiones de hoja de enlace y V1/V2 presentes en gp120 de VIH-1, encontrando como principales regiones reactivas ARG440 y los aminoácidos en posición 208-200 quienes entran en contacto con los aminoácidos de CCR5 7-15.

Un análisis minucioso entre las gráficas de las interacciones en C8R1 y C4R4, ambas referentes al encuentro entre ECL2 de CCR5 y V3 de gp120 en complejo con CD4, muestran dos sitios esenciales de reacción, uno, el ya discutido en C8R1 donde los aminoácidos participantes de V3 son la región 300-305, en el otro caso C4R4 muestra una región opuesta de interacción en V3, la región 318-322 y 305. En C4R4 se ha permitido la flexibilidad absoluta de la cadena peptídica de ECL2, y eso explica también las bajas energías de enlace obtenidas referente a esta corrida, aunque la energía intermolecular no ha sido mejor que en C8R1, la energía interna (-11 Kcal/mol contra 0.0 Kcal/mol desplegadas en C8R1) se explica también por la misma flexibilidad concedida en la libertad de torsiones a esta cadena peptídica ECL2 en C4R4, pero esto también la aleja un tanto de la realidad conformacional posible para ECL2. La corrida 4 se diseñó con el objetivo de observar las preferencias de enlace particular de cada aminoácido en ECL2, y esta información indica que las mejores interacciones en ECL2 las tienen las posiciones aminoacídicas 169-173 que han sido una región de alto contacto, por lo que es de esperarse que en una interacción real de ECL2 contra V3, esta sea la región que

busque interactuar con V3 de gp120, de hecho, al observar C8R1 los aminoácidos que interactuaron por parte de ECL2 fueron las posiciones 172-174 y 179, lo que confirma que el par 172-173 de ECL2 es sumamente importante en su reacción para estabilizar el producto complejo ECL-V3. Por otro lado, en V3 de gp120 el aminoácido LYS305 ha sido el único común entre C4R4 y C8R1. Luego se observa que las dos áreas opuestas a lo largo de V3 son muy reactivas para ECL2 alcanzando menor energía intermolecular C8R1 con el contacto en la región 300-305 en comparación a C4R4 que presenta una interacción en la región 318-322 de V3 pero con una diferencia poco significativa, el impedimento en realidad es de tipo conformacional para C4R4.

Observando nuevamente la regla 11/25 puede sugerir este dato que cuando las posiciones 11 y 25 de V3 están cargadas positivamente entonces la cepa se comporta como X4 porque ECL2 puede arribar al choque con V3 por cualquiera de los dos lados y encuentra la misma respuesta. Esta explicación sería consistente con el hecho de que, para cepas X4/R5, lo que sucede es que uno de ambos aminoácidos en posición 11 ó 25 se encuentra cargado positivamente, de manera que si ECL2 se acerca por el lado positivo, la cepa se comportará como X4, mientras que si arriba por el lado negativo se comportará como R5, y si ambos lados, el 11 y el 25 se encuentran cargados negativamente o neutro, la cepa que reaccionaría sería únicamente R5. En conclusión en V3 existe más de un sitio en donde puede interactuar con ECL2, por lo que existe la formación de diferentes epítomos inducidos en V3 para los correceptores CXCR4 y CCR5.

Esta conclusión permite proponer una mecánica de interacción de V3 con ECL2. Siendo consistente con los tres modelos teóricos

planteados por Liu S.Q. Y sus colaboradores, el segmento N-terminal es el primero en encontrar al segmento V1/V2 y la hoja puente de gp120 comenzando la interacción entre el complejo CD4 y gp120, lo siguiente es el acoplamiento de esta cadena de aminoácidos, este momento exacto sería un intermediario previo al entrar en contacto con el segmento ECL2 y según la regla 11/25 y los argumentos previamente explicados, podría encontrarse CD4-gp120 en un movimiento relativo a CCR5 al que se encuentra semi unido por un pivote de giro que sería el segmento CCR5 N-terminal unido a V1/V2, pero este movimiento de incertidumbre caracterizará la próxima interacción según el lado en que arribe V3 al segmento ECL2 de CCR5, el cual también podría estar regido por el campo energético de los aminoácidos de la región V3.

Al realizar una comparación con los resultados obtenidos por Paul R. Gorry (2007)⁹ los aminoácidos importantes en V3 de gp120 son TYR308, ASP321/ILE317 (aparte de LYS442, GLU444 y TYR330 que están en otras regiones de gp120). Estas posiciones 308, 321 y 317 son semejantes a las reportadas en R6C1, R6C13 y C6R14. Estos resultados señalan que no hay una interacción específica entre ECL2 y V3, pero si se puede decir que V3 no solo es altamente afín a ECL2 sino que parece estar diseñado de tal manera que ofrece un epítomo de contacto diferente según la situación en que se encuentra al enlazar a ECL2, distinguiendo tres áreas importantes en V3: a- las posiciones 300-305; b- las posiciones 307-308; c- las posiciones 314-322.

El mismo trabajo de Paul R. Gory (2007)⁹ enseña que las posiciones en V3 por él estudiadas: 308, 317 y 321 no son ni suficientes, ni indispensables, por lo que se propone que trabajan en conjunto para enlazar efectivamente a ECL2. En acuerdo con este trabajo C6R14 es la única respuesta donde

interactúan en pleno las regiones mencionadas y que a pesar de que la posición física de V3 no sea probablemente la mejor respecto a ECL2, esta interacción es la más cercana a una interacción real donde participarían todas las partes aquí mencionadas, y que además posee una energía intermolecular muy aceptable (-3.04 Kcal/mol).

Mecanismos de interacción y de reacción del segmento variable V3 de gp120 con el correceptor CCR5

Los resultados obtenidos concuerdan con los desarrollados por el grupo de Liu S.Q. En 2003, en este trabajo se describe cómo el acercamiento del complejo CD4-gp120 a CCR5 se da por el extremo N-terminal de CCR5 el cual se encuentra extendido hacia el espacio exterior de la membrana celular, por lo cual la serie de aminoácidos que entran en contacto en primera instancia serían SER6 y SER7 – VAL120 LYS121 LEU122 de gp120 (190).

Esta interacción debe permitir el acercamiento de la ARG440 de gp120 en la hoja de enlace, hacia TYS14 de la región N-terminal de CCR5 en una desprotonación del oxígeno del grupo sulfato que resulta en una resonancia sumamente estable para el grupo sulfotirosilo, de la misma manera que para la arginina, estableciendo un enlace salino. El efecto de esta interacción TYS-ARG debe desencadenar un efecto domino que reorienta a un plegamiento de toda la sección N-terminal en CCR5, obligándola a unirse cuando menos en las regiones 1-15 del correceptor CCR5 a la región V1/V2 de gp120 liberando energía de enlace por las interacciones de Van der Waals generadas y por la formación de puentes de hidrógeno. Este debe ser el momento crucial para el enlace en V3, puesto que mientras que la región N-terminal se encuentra en plegamiento, V3 de gp120 se está acercando hacia el segundo segmento extracelular orientándose por

el campo electrostático generado en gran medida por la ARG315 que se encuentra precisamente en la cresta de V3 que junto con PRO313 que son aminoácidos potencialmente atractivos a algunos en CCR5 como LEU174. Una vez que el acercamiento entre estos grupos cargados se da, ECL2 se debe reorientar en busca de un enlace estable por medio de semi reacciones reversibles entre los aminoácidos de ambas regiones hasta alcanzar un punto de equilibrio cambiando la conformación de los ángulos dihedrales en los aminoácidos de la región 169-173 de ECL2 con la finalidad de estabilizar el sistema.

Mecanismos de Reacción

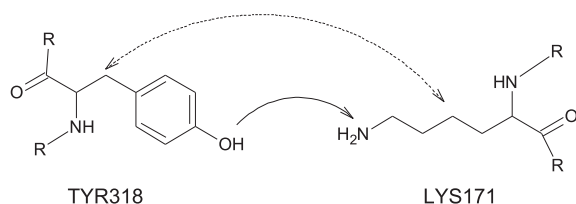
Para las mejores soluciones encontradas que son: C8R1, C6R14 y las interacciones descritas en C4R4, se presenta a continuación un detalle de los mecanismos de reacción para determinar la estabilidad de los productos formados, puesto que como se ha mencionado Autodock posee limitantes en la libertad de rotación de enlace.

Análisis de C4R4

C4R4 provee información importante para observar cuáles interacciones entre V3 y ECL2 de CCR5 son las responsables del aumento de la estabilidad por liberación de energía de enlace entre estas secciones protéicas, por lo cual, se detallan a continuación los mecanismos de reacción entre los enlaces sugeridos por el programa Autodock.

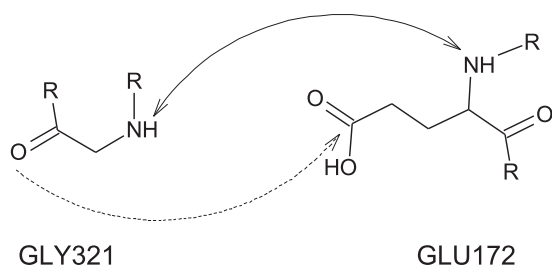
La Gráfica No.6 Derecha muestra que existen interacciones entre TYR318 y LYS171 las cuales son producto de las fuerzas Van der Waals generadas por inducción dipolo-dipolo inducido entre la amina de cadena lateral presente en LYS171 y el carbono de cadena lateral de TYR318, según lo propone el mismo

programa Autodock, que además sugiere interacciones entre el grupo hidroxilo de esta tirosina y y la cadena carbonada de la lisina, sin embargo sería más favorable para la estabilidad del enlace si las interacciones se dieran entre las cadenas carbonadas y entre los grupos polares de ambos aminoácidos como se sugiere a continuación:

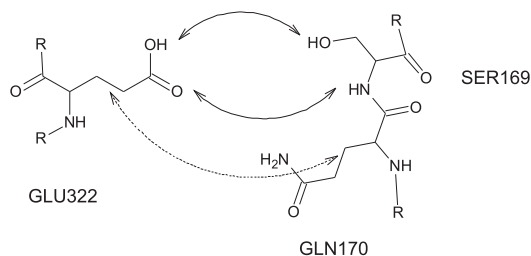


esta incoherencia sugerida por el programa es producto de la rigidez de las cadenas, que es la condición asignada durante la Corrida 4.

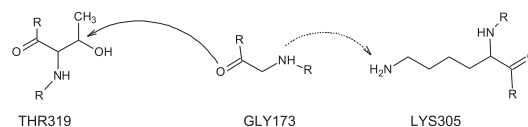
Además en C4R4 se puede observar que GLY321 interactúa con GLU172 formando un puente de hidrógeno señalado en la Gráfica No.6 Derecha como puntos verdes. Estos aminoácidos también interactúan en el oxígeno carboxílico de GLY321 y el carbono alfa y el hidrógeno ácido del mismo GLU172 interacción que se considera



sumamente estable. También se observan choques de orbitales moleculares entre GLU322 y la secuencia SER169-GLN170 los cuales son descritos como una atracción dipolo-dipolo entre los grupos R laterales de GLU322 y SER169, además de probables fuerzas de atracción de London presentes entre GLU322 y GLN170.



Por otra parte se debe señalar la doble interacción que posee la GLY173, tanto con el carbono electropositivo presente en THR319 como con la interacción con la amina de cadena lateral de LYS305.



Análisis de C6R14

En esta interacción se observa que los grupos amino de ARG304 tienen una fuerte atracción con los nitrógenos presentes en HIS175 puesto que los protones de ambos generan las cargas parciales positivas que atraen a los pares electrónicos libres de los nitrógenos, en la Gráfica No. 7 se observa cómo los orbitales moleculares de estos grupos se acercan, lo que hace probable un intermediario de resonancia entre estos aminoácidos. Además la flecha punteada recta que se observa entre ARG304 e HIS175 representa las fuerzas de Lon-

