



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNICA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIO DEL EFECTO DE MUTACIONES PUNTUALES
DEL PÉPTIDO IDR-1002 SOBRE LA TRANSLOCACIÓN AL
NÚCLEO DE LA PROTEÍNA Nrf2, UTILIZANDO MÉTODOS
EXPERIMENTALES Y COMPUTACIONALES**

TESIS DE MAESTRÍA QUE PRESENTA:

BIOL. MARCO ANTONIO ROMERO DURÁN

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

EN LA OPCIÓN DE:

MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR

ASESOR:

DR. VÍCTOR MANUEL BAIZABAL AGUIRRE

CO-ASESOR:

DR. JOSÉ MANUEL PÉREZ AGUILAR

MORELIA, MICH, MÉXICO MAYO DE 2021

Dedicada a:

Mis padres y Abuelos, por su amor y apoyo incondicional, por inculcarme valores que me han permitido alcanzar esta meta.

A Mis hermanos por estar ahí para mí cuando los necesito, por su apoyo y ayuda en cualquier momento.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial Dr. Pedro Navarros Santos, Dr. Marco Cajero Juárez y Dr. Juan José Valdez Alarcón por su apoyo y todas sus observaciones para enriquecer este trabajo.

Al Dr Víctor M. Baizabal, por su apoyo y enseñanzas brindadas y por los consejos que a cada paso me brindó durante el desarrollo de este proyecto

Al Dr. José Manuel Perez Aguilar por ser parte fundamental del análisis teórico, por su tiempo y dedicación para que este trabajo fuera de gran calidad.

Al CONACYT por la beca otorgada para estudiar la Maestría en Ciencias durante el periodo Marzo-2019 a Febrero-2021.

Los hombres de ciencia sospechan algo sobre ese mundo, pero lo ignoran casi todo. Los sabios interpretan los sueños, y los dioses se ríen.

H. P. Lovecraft

ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. ANTECEDENTES BIOLÓGICOS	1
1.1.1. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y SU RELACIÓN CON EL FACTOR DE TRASCIPCIÓN Nrf2.....	1
1.2. ESTRUCTURA DE Nrf2.....	2
1.3. ESTRUCTURA DE KEAP1	3
1.4. VIA DE SEÑALIZACIÓN KEAP1-Nrf2.....	4
1.5. Nrf2 Y β -TRANSDUCINA.....	6
1.6. Nrf2 Y SU REGULACIÓN POR LA CASEÍNA-CINASA 2 (CK2).....	7
1.7. LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 COMO TERAPIA DIRIGIDA EN EL DAÑO RENAL CRÓNICO	7
1.8. IMPORTANCIA DE LOS PÉPTIDOS DE DEFENSA DEL HOSPEDERO EN PROCESOS CELULARES.....	8
1.9. ANTECEDENTES DE LABORATORIO	9
2. ANTECEDENTES COMPUTACIONALES.....	11
2.1. QUÍMICA COMPUTACIONAL	11
2.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	12
2.3. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR	14
2.4. CAMPOS DE FUERZA	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS:.....	18
5. OBJETIVO GENERAL:.....	18
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS	19
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO	19
7.1.1. PÉPTIDO IDR-1002	19
7.1.2. LÍNEA CELULAR HEK 293.....	19
8. METODOLOGÍA TEÓRICO-COMPUTACIONAL	19
8.1. GENERACIÓN <i>IN SILICO</i> DE LAS MUTANTES DE IDR-1002	19
8.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LAS MUTANTES DE IDR-1002 C Nrf2	20
9. ESTUDIO BIOQUÍMICO-EXPERIMENTAL.....	21
9.1. CARACTERÍSTICAS DE LA LÍNEA CELULAR HEK293	21

9.2.	ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS HEK293 CON EL PÉPTIDO IDR 1002 NATIVO Y MUTANTES.....	21
9.3.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA.....	22
9.4.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL, CITOPLÁSMICA Y NUCLEAR.....	22
9.5.	DETECCIÓN DE Nrf2 POR ENSAYO TIPO WESTERN BLOT	23
9.6.	CUANTIFICACIÓN DE Nrf2 POR ELISA.....	24
9.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
10.	RESULTADOS	24
10.1.	ANÁLISIS TEÓRICO COMPUTACIONAL	24
10.1.1.	INTERACCIÓN DE IDR-1002 CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2 POR ACOPLAMIENTO MOLECULAR	24
10.2.	INTERACCIÓN DE IDR-1002 MODELO 7 Y MODELO 10 CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2 POR DINÁMICA MOLECULAR	27
10.3.	INTERACCIÓN DE IDR-1002 CON IDR-1002-R3A, IDR-1002-R9A E IDR-1002-R11A CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2 POR DINÁMICA MOLECULAR..	30
10.3.1.	ANÁLISIS DE ESTRUCTURA (RMSD Y RADIO DE GIRO)	34
10.3.2.	ANÁLISIS DE LA ENERGÍA DE INTERACCIÓN.....	40
10.4.	ESTUDIO BIOQUÍMICO EXPERIMENTAL.....	42
10.4.1.	DETECCIÓN DE Nrf2 POR WESTERN BLOT	42
10.4.2.	DETECCIÓN DE HEMOXIGENASA 1 (HO-1) POR WESTERN BLOT.....	43
10.4.3.	CUANTIFICACIÓN DE Nrf2 POR ENSAYO DE ELISA.....	44
10.5.	DISCUSIÓN	45
10.6.	CONCLUSIONES.....	50
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	51

Lista de Figuras

Figura 1. Dominios estructurales de Nrf2 (A). Dominios estructurales de Keap1 (B).....	4
Figura 2. Vía de señalización de Nrf2 regulada por especies reactivas de oxígeno.....	6
Figura 3. IDR-1002 inhibe la expresión de COX-2 y la translocación al núcleo de NF-kB en macrófagos RAW264.7.....	9
Figura 4. Los péptidos IDR-1002, 1018, 1 y HH2 activan la translocación de Nrf2 al núcleo en células epiteliales HEK293.....	10
Figura 5. Estructuras superpuestas de los complejos Nrf2/IDR-1002 y Nrf2/Keap1.....	10
Figura 6. Un modelo clásico de campo de fuerza (FF).....	17
Figura 7. Interacción del motivo DLG de Nrf2 (gris) con IDR-1002 (rosa) modelo 10.....	19
Figura 8. Interacción del motivo DLG de Nrf2 (gris) con IDR-1002 (amarillo) modelo 7....	20
Figura 9. Principales interacciones entre IDR-1002 y Neh2 de Nrf2 del modelo 7 generadas por simulación atomística de dinámica molecular, durante un periodo de 1000 ns.....	21
Figura 10. Principales interacciones entre IDR-1002 y Neh2 de Nrf2 del modelo 10 generadas por simulación atomística de dinámica molecular, durante un periodo de 1000 ns.....	22
Figura 11. Comparación de los modelos 10 y 7 obtenidos por simulaciones atomísticas de dinámica molecular entre IDR-1002 y Neh2-Nrf2.....	23
Figura 12. Interacción ente IDR-1002-R9A y Neh2 del modelo 7.....	25
Figura 13. Interacción entre IDR-1002-R9A y Neh2 del modelo 10.....	25
Figura 14. Interacción entre IDR-1002-R11A y Neh2 del modelo 7.....	26
Figura 15. Comparación del modelo 10 del péptido nativo (Panel A) y modelo 7 (IDR-1002-R11A) (Panel B)	26
Figura 16. Valores de RMSD con respecto al tiempo de simulación de DM del Modelo 7...30	
Figura 17. Análisis de distancias de las interacciones de la simulación de DM del Modelo 7.....	30
Figura 18. Valores de RMSD y radio de giro (rGyration) con respecto al tiempo de simulación de DM del Modelo 10.	31
Figura 19. Análisis de distancias de las interacciones de la simulación de DM del Modelo 10.	32

Figura 20. Residuos principales del motivo DLG-Neh2-Nrf2 y del péptido IDR-1002.....	33
Figura 21. Análisis de fluctuaciones de energía de interacción electrostática, de van der Waals y total de no enlace del modelo 7.....	34
Figura 22. Análisis de fluctuaciones de energía de interacción electrostática, de van der Waals y total de no enlace del modelo 10.....	34
Figura 23. Análisis de fluctuaciones de energía de interacción electrostática, de van der Waals y total de no enlace del Modelo 7 (Mutante R9A) durante los últimos 50 ns de la simulación	35
Figura 24. El péptido IDR-1002 promueve la translocación al núcleo de Nrf2 en células HEK293.....	36
Figura 25. El péptido IDR-1002 promueve la expresión nuclear de HO-1 en células HEK293.....	37
Figura 26. IDR-1002 induce la translocación al núcleo de Nrf2 en células endoteliales de bovino (CEB).....	38

RESUMEN

El factor de transcripción Nrf2 es fundamental para disminuir la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas en la respuesta inflamatoria causada por daño tisular, debido al estrés oxidante. El bloqueo de la interacción entre Keap1 y Nrf2, por medio de inhibidores, ha sido una estrategia que ha permitido promover la activación exógena de Nrf2, induciendo así la expresión de genes antioxidantes. Estos inhibidores pueden usarse como coadyuvantes para el tratamiento o prevención de varios padecimientos que cursan con inflamación, como enfermedades renales, cardiovasculares, diabetes, Alzheimer, Parkinson y cáncer. Estudios experimentales y computacionales de acoplamiento molecular en nuestro laboratorio han sugerido que el péptido antiinflamatorio IDR-1002 (VQRWLIVWRIRK-NH₂) activa la translocación al núcleo de Nrf2, mediante su unión con la región de interacción a Keap1, específicamente en el motivo de baja afinidad DLG. Resultados computacionales de simulaciones atomísticas de dinámica molecular (DM) muestran que los aminoácidos de IDR-1002 que contribuyen principalmente a esta unión son R3, R9 y R11. Con la idea de explorar la importancia de estos residuos de aminoácidos en la interacción Nrf2-IDR-1002, se decidió mutar cada uno de estos residuos por A. Posteriormente, se procedió a simular por DM durante un periodo de 1000 ns la interacción entre IDR-1002 y cada una de las mutantes puntuales IDR-1002-R3A, IDR-1002-R9A y IDR-1002-R11A con Nrf2. Los resultados indican que la mutación R9A causó un cambio conformacional más significativo en la unión del péptido con Nrf2, perdiéndose la interacción establecida previamente con D27 y D29 de Nrf2. En las otras dos mutantes puntuales se mantienen las interacciones entre IDR-1002-R3A y E35 de Nrf2 y IDR-1002-R11A con D29 de Nrf2. Este análisis mostró que la mutación puntual IDR-1002-R9A fue suficiente para comprometer la interacción con Nrf2. Nuestros datos computacionales son congruentes con los resultados experimentales obtenidos en células de epitelio renal Hek-293 y células endoteliales de bovino E6-E7 con IDR-1002-R9A, donde se observó que este péptido mutado causó una menor translocación de Nrf2 al núcleo y una menor expresión de la enzima cito-protectora y antioxidante hemoxigenasa 1, comparado con el péptido nativo, IDR-1002. Estos resultados profundizan más en el potencial farmacológicos futuro de péptidos para tratar la inflamación al promover la activación de Nrf2.

Palabras claves: IDR-1002, Nrf2, Mutantes puntuales, Translocación nuclear, Dinámica molecular.

ABSTRACT

The transcription factor Nrf2 is essential to decrease the concentration of reactive oxygen species (ROS) produced in the inflammatory response caused by tissue damage, due to oxidative stress. The disruption of interaction between Keap1 and Nrf2, by means of inhibitors, has been a strategy that has made it possible to promote the exogenous activation of Nrf2, thus inducing the expression of antioxidant genes. These inhibitors can be used as adjuvants for the treatment or prevention of various conditions associated with inflammation, such as kidney and cardiovascular diseases, diabetes, Alzheimer's, Parkinson's and cancer. Experimental and computational studies of molecular docking in our laboratory have suggested that the anti-inflammatory peptide IDR-1002 (VQRWLIVWRIRK-NH₂) activates the translocation to the nucleus of Nrf2, through its binding with the Keap1 interaction region, specifically in the low affinity motif DLG. Computational results of atomistic molecular dynamics (DM) simulations show that the amino acids of IDR-1002 that mainly contribute to this binding are R3, R9 and R11. With the idea of exploring the importance of these amino acid residues in the Nrf2-IDR-1002 interaction, it was decided to mutate each of these residues by A. Subsequently, the interaction between IDR-1002 and each of the point mutants IDR-1002-R3A, IDR-1002-R9A and IDR-1002-R11A with Nrf2 was simulated by DM for a period of 1000 ns. The results indicate that the R9A mutation caused a more significant conformational change in the binding of the peptide with Nrf2, losing the previously established interaction with D27 and D29 of Nrf2. In the other two point mutants the interactions between IDR-1002-R3A and E35 of Nrf2 and IDR-1002-R11A with D29 of Nrf2 are maintained. This analysis showed that the IDR-1002-R9A point mutation was sufficient to compromise the interaction with Nrf2. Our computational data are congruent with the experimental results obtained in Hek-293 renal epithelial cells and E6-E7 bovine endothelial cells with IDR-1002-R9A, where it was observed that this mutated peptide caused a lower translocation of Nrf2 to the nucleus and a lower expression of the cytoprotective and antioxidant enzyme hemoxygenase 1, compared to the native peptide, IDR-1002. These results delve further into the future pharmacological potential to treat inflammation by promoting Nrf2 activation. These results delve further into the future pharmacological potential of peptides to treat inflammation by promoting Nrf2 activation.

Key words: IDR-1002, Nrf2, Points mutants, Nuclear translocation, Molecular dynamics.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES BIOLÓGICOS

1.1.1. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y SU RELACIÓN CON EL FACTOR DE TRASCRIPTIÓN Nrf2

El término estrés oxidativo fue introducido en 1985 por Sies (Sies, 1985). Años después fue asociado como un factor clave causante de enfermedades relacionadas con la toxicidad del oxígeno en las células (Breitenbach y Eckl, 2015). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son compuestos que se derivan de la molécula de oxígeno (O₂) como un producto de su excitación o por reducción química parcial. Se sabe que en las células las especies reactivas de oxígeno pueden proceder de fuentes exógenas o endógenas (Phaniendra *et al.*, 2015). Entre las moléculas que se consideran ERO se encuentran los radicales libres que pueden ser definidos como un átomo o una molécula que contiene uno o más electrones desapareados en alguno de sus orbitales electrónicos siendo capaces de existir de forma independiente pudiendo formarse por la pérdida o por la ganancia de un electrón único desde un compuesto no radical, algunos ejemplos de estos son el radical hidroxilo (OH[•]), oxígeno singlete, hipoclorito, radical de óxido nítrico (•NO) y radical peroxinitrito (ONOO⁻) (Phaniendra *et al.*, 2015). Las ERO también incluyen peróxidos como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), superóxidos como el anión superóxido (O₂⁻), y el ozono (O₃) (Onyango, 2016).

En condiciones fisiopatológicas el estrés oxidante y la inflamación son procesos que ocurren frecuentemente como causa-efecto. En circunstancias reales los seres vivos están constantemente atacados por innumerables agresiones originadas por estímulos, tales como la hipoxia, infecciones microbianas, toxinas y xenobióticos, lo que activa la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas ERO provocan estrés oxidante, daño y muerte celular, y pueden coadyuvar al desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedades renales crónicas, arterosclerosis, Alzheimer y Parkinson, que son patologías de tipo infeccioso, inmune e inflamatorio (Itoh *et al.*, 2004).

Se sabe que además de provocar patologías en el sistema inmune, las propias células del sistema inmune como los fagocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos) también contribuyen a la generación de ERO como parte de sus mecanismos de defensa contra patógenos (Bravo & López, 1998). Este mecanismo está bien caracterizado, especialmente para neutrófilos y macrófagos de origen alveolar humano en los que se ha demostrado que al inicio del proceso fagocitario estas células muestran un aumento notable en el consumo de oxígeno 100 veces más que en condiciones normales (Chen *et al.*, 2003; Iles & Forman, 2002); además se conoce que este proceso no es inhibido por el cianuro o la azida sódica, potentes inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (Cittadini *et al.*, 1971; Ramírez & Molina, 2009). A este acelerado consumo de oxígeno se le conoce como “estallido respiratorio” (*respiratory burst*) (Dahlgren & Karlsson, 1999; Chen *et al.*, 2003) y no está relacionado

con el transporte mitocondrial de electrones, pero si con la activación del sistema enzimático (NADPH-oxidasa) que oxida al NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) proveniente del ciclo de las pentosas fosfato, a su vez los electrones generados en este proceso son utilizados para reducir al oxígeno que se transforma en anión superóxido, donde este último también puede ser transformado en peróxido de hidrógeno; los análisis de estas moléculas oxidantes en la fagocitosis han mostrado incrementos en sus concentraciones de 0,1 -1 M (Chaves *et al.*, 1996).



Por otra parte, se ha demostrado que a bajas concentraciones algunas de estas mismas ERO tienen efectos benéficos porque promueven la activación de factores de transcripción y de cascadas de señalización intracelular, que inician y controlan la respuesta inflamatoria (Blouin *et al.*, 2004). La respuesta inflamatoria es un mecanismo de defensa importante del sistema inmune innato. Esta respuesta es la encargada de la eliminación de bacterias causantes de infección y de la reparación de tejidos dañados debido a factores físicos, químicos (i.e. estrés oxidante) o mecánicos (D'Ignazio *et al.*, 2016).

En este contexto, el factor de transcripción intracelular Nrf2 [factor nuclear relacionado con el factor eritroide-2 (NF-E2)] aparece como un sistema regulador clave en la expresión de numerosos genes que codifican diversas enzimas antioxidantes, factores detoxificantes, proteínas con actividad anti-apoptótica y proteínas transportadoras de fármacos. La función principal de todas ellas es la de salvaguardar a las células del estrés oxidante y electrofílico éste último caracterizado por compuestos que reaccionan de manera covalente con macromoléculas celulares, aceptando electrones generando metabolitos altamente reactivos y tóxicos (Sajadimajd y Khazaei, 2018; Oakley, 2011).

1.2. ESTRUCTURA DE Nrf2

El factor de transcripción Nrf2 es muy importante en el control de la respuesta inflamatoria, debido a que regula la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, por medio del reconocimiento de una secuencia específica de ADN cis (5'-GTGACNNNGC-3') conocida como ARE (*Antioxidant Response Elements* o elementos de respuesta antioxidante) (Rushmore *et al.*, 1991; Königsberg, 2007). Nrf2 pertenece a una familia de proteínas con estructura de “zipper” o cremallera de leucinas (bZip) en su región C-terminal que funciona como activador transcripcional. La región básica, hacia la región N-terminal, de bZip es la responsable de la unión al ADN (Lee & Johnson, 2004). Nrf2 tiene un motivo conservado similar al presente en *Drosophila* denominado “cap-N-collar” (CNC) (Königsberg, 2007). Se han incluido 4 proteínas de mamíferos dentro de esta familia: Nrf1, Nrf2, Nrf3 y NF E2 p45, (Motohashi, 2004). Nrf1 y Nrf2 regularmente se expresan en los mismos tejidos; sin embargo, Nrf2 muestra una tasa de transactivación de genes más alta. Además, mientras que Nrf1 está regulado por la glucosilación y desglucosilación y actúa principalmente en el retículo endoplásmico,

Nrf2 lo hace por un mecanismo de ubiquitinación dependiente de Keap1 (Katoh *et al.*, 2001; Bugno *et al.*, 2015). Nrf2 es expresado principalmente en órganos sustanciales para el metabolismo y la detoxificación tales como el hígado y el riñón, así como la piel, pulmón y el tracto digestivo (Motohashi, 2004). Nrf3 se expresa en placenta, células B y monocitos, está unido a la membrana del retículo endoplásmico por su región N-terminal, y se homodimeriza con proteínas Mafs (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog, por sus siglas en inglés) pequeñas para la unión del ADN (Tebay *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2009). Por último, NF-E2 p45 se expresa en tejido hematopoyético y participa en la generación de plaquetas (Mignotte *et al.*, 1989).

Nrf2 posee siete dominios conservados denominados Neh (Nrf2, ECH [chicken Nrf2] homologous domain) (Figura 1A). El dominio Neh1 posee la región CNC (Cap N Collar) y el zipper o cremallera de leucinas (CNC-bZIP) para la unión al ADN y a las proteínas Maf. La secuencia de aminoácidos de la región básica en la región intermedia de este dominio, está altamente conservada entre una amplia diversidad de especies, sugiriendo un mismo origen ancestral para estas proteínas (Fuse y Kobayashi, 2017). El dominio Neh2 contiene dos motivos, uno con alta afinidad (ETGE) y uno con baja afinidad (DLG) que participan en la unión con Keap1. Neh3, Neh4 y Neh5 son dominios de transactivación e interaccionan con la proteína de unión a CREB (CBP) un coactivador transcripcional en el núcleo celular (Katoh *et al.*, 2001). La fosforilación catalizada por diversas proteínas cinasas del dominio Neh6 en una región rica en residuos de Ser regula también la actividad de Nrf2. El dominio Neh6 contiene dos sitios de unión (motivos DSGIS y DSAPGS). El motivo DSGIS en el extremo N de Neh6 es fundamental para su fosforilación dependiente de GSK3 β y para la ubiquitinación posterior mediada por repeticiones de β -transducina (β -TrCP, adaptador de sustrato para el complejo de ubiquitina ligasa Skp1–Cul1–Rbx1/Roc1) (Fuse y Kobayashi, 2017). La fosforilación del motivo DSGIS por GSK3 β aumenta la capacidad de complejo ligasa β -TrCP / Cul1 E3 de ubiquitar a Nrf2 controlando su degradación a través de la vía proteasomal 26S como mecanismo principal de la degradación de Nrf2 en condiciones de estrés oxidante o electrofílico fuerte; a su vez, GSK-3 debe ser activado antes de que Nrf2 restablezca la homeostasis redox de lo contrario las células deberían morir como consecuencia del estrés oxidante. (McMahon *et al.* 2004; Rada *et al.* 2011, Chowdhry *et al.*, 2013). Recientemente el dominio Neh7, se ha propuesto como un nuevo dominio de Nrf2 participando en la unión al ADN del receptor de retinoides X α (RXR α), causando la supresión de la actividad de Nrf2, puesto que evita el reclutamiento de dominios co-activadores como lo son Neh4 y Neh5 que interactúan con la proteína de unión a CREB (Lu *et al.*, 2013).

1.3. ESTRUCTURA DE KEAP1

Diversos estudios sobre la actividad de Nrf2 en sistemas de hibridación en levaduras han contribuido a la identificación de la proteína Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), encargada de suprimir hasta en un 80% la translocación de Nrf2 al núcleo y, por tanto, la actividad transcripcional

de Nrf2 (Kensler *et al.*, 2007). Las proteínas Keap1 de mamíferos son metaloproteínas de 624 aminoácidos que contienen en la región intermedia (IVR) varios residuos de cisteína, un dominio de dimerización Bric-a-brac (BTB) y un dominio con seis repeticiones Kelch, que funciona como sitio de acoplamiento de proteínas (Figura 1B) (Kensler *et al.*, 2007; Hayes & McMahon, 2009). Las proteínas Keap1 de humanos contienen 27 Cys, de las cuales la mitad son altamente reactivas ya que están situadas al lado de los aminoácidos básicos. De los residuos de cisteína (Cys) que contiene Keap1, solo son reactivas la Cys23, Cys151, Cys273 y Cys288. Se ha demostrado que las mutaciones de estos residuos en Keap1 causan la pérdida de la regulación negativa de Nrf2. Además, la oxidación de la Cys151 determina la liberación de Nrf2, por lo que a Keap1 se le ha considerado como un regulador maestro en la respuesta antioxidante, al mediar la ubiquitinación de Nrf2 (Kobayashi *et al.*, 2006). La interrupción selectiva de la interacción entre Keap1 y Nrf2 ha emergido como una estrategia prometedora para desarrollar fármacos que funcionen como antioxidantes, antiinflamatorios, agentes anticancerígenos y agentes terapéuticos de enfermedades tales como el daño renal crónico (DRC), donde se ha observado que, en etapas tempranas, la actividad de Nrf2 previene la lesión renal y la muerte celular. La eliminación de Nrf2 o su nula actividad propicia la aparición de la enfermedad. Este dato tiene relevancia importante, puesto que el DRC es una de las diez primeras causas de muerte en México (Inegi, 2017; Ersson *et al.*, 2011).

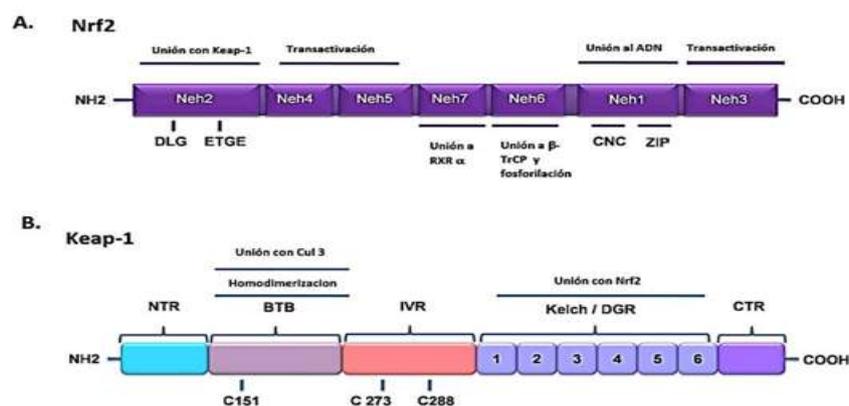


Figura 1. Dominios estructurales. Nrf2 en (A) y Keap1 en (B) (Namani *et al.*, 2014).

1.4. VIA DE SEÑALIZACIÓN KEAP1-Nrf2

En ausencia de estrés oxidante, la actividad del factor de transcripción Nrf2 está reprimida constitutivamente por su unión con Keap1 y con el citoesqueleto. Keap1 se une a Cul3 (Cullin-3), que a su vez se une a Rbx1 (Ring-box protein1) para formar el complejo Keap1-Cul3-Rbx1-E3 ligasa de

ubiquitina que promueve, en condiciones basales, la ubiquitinación de Nrf2 y su degradación en el proteasoma (Kobayashi & Yamamoto, 2006; Chen *et al.*, 2009). Cuando la célula experimenta un incremento de ERO, la oxidación de algunas Cys presentes en Keap1 causa un cambio conformacional, lo que libera a Nrf2 para ser translocado al núcleo, donde forma un complejo con otras proteínas nucleares (i.e. Maf) (Figura 2). Tal interacción promueve la transactivación de genes citoprotectores con al menos un ARE para inducir la síntesis de enzimas antioxidantes y detoxificantes de fase I y fase II (Namani *et al.*, 2014). Durante la fase I las enzimas transforman productos tóxicos en formas intermedias que funcionan como plataforma a la llegada de las enzimas de fase II (Iyanagi, 2007), proceso que incrementa la producción de radicales libres por lo cual son necesarios neutralizadores que faciliten la transición entre fase I y fase II como el glutatión o enzimas de la familia de los citocromos P450 que durante la fase I ayudan a metabolizar carcinógenos y xenobióticos (moléculas exógenas ajenas al huésped), y llevan a cabo reacciones de óxido-reducción que introducen o exponen grupos funcionales para que puedan ser reconocidos por enzimas de la fase II (Kobayashi & Yamamoto, 2006; Holtzclaw *et al.*, 2004). Durante la activación de la fase II las enzimas protegen las células contra los efectos dañinos de moléculas electrofílicas y oxidantes que subyacen a la aparición del cáncer y otras enfermedades degenerativas por acción de metabolitos procarcinógenos originados durante la fase I (Miller *et al.*, 1961). Durante la fase II de detoxificación, participan proteínas tales como la flavoproteína NADPH: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), la glutatión-S transferasa (GST), las UDP-glucuronosil transferasas, la hidrolasa epóxica, la glutamil cisteína sintetasa, la ferritina, la hemo oxigenasa 1 entre otras, que reducen las moléculas electrofílicas de los metabolitos carcinogénicos y xenobióticos modificados, mediante su conjugación (modificación química de moléculas) enzimática con ligandos endógenos como el glutatión (glutatión S-transferasas) o el ácido glucurónico (UDP-glucuronosiltransferasas) (Itoh *et al.*, 1997; Decoursey & Ligeti, 2005; Bélanger *et al.*, 2003), los inductores genéticos de la fase II son muy variados pero todos comparten una característica muy particular y es que la mayoría reaccionan con grupos tiol (mediante reacciones de alquilación u oxidoreducción) promoviendo regulación transcripcional y potenciando la activación de factores de transcripción (Fahey & Talalay, 1999), basados en esta evidencia se propuso que el “sensor” maestro del estrés electrofílico u oxidante debería contener residuos reactivos de cisteína “Cys” (Holtzclaw *et al.*, 2004); en este contexto se descubrió que la proteína Keap1 es rica en cisteína, posee múltiples dominios que residen en el citoplasma en unión con el citoesqueleto de actina a través de su dominio Kelch, con un dominio intermedio (IVR) con cisteínas altamente reactivas que reaccionan a los inductores generando cambios conformacionales en Keap1 promoviendo la disociación con Nrf2, Nrf2 se transloca al núcleo celular e induce la transcripción de genes de fase 2 de detoxificación (Lee & Johnson, 2004; Kobayashi & Yamamoto, 2006; Chen *et al.*, 2009; Komatsu *et al.*, 2010).

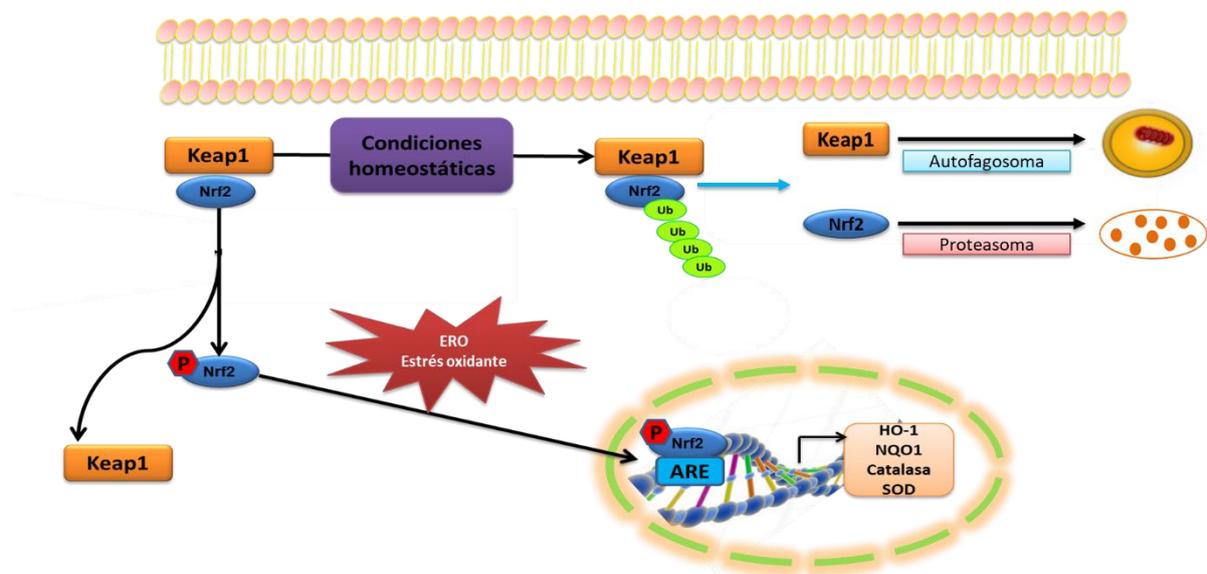


Figura 2. Vía de señalización Keap-Nrf2 regulada por especies reactivas de oxígeno (ERO). La actividad de Nrf2 se encuentra regulada constitutivamente por su interacción con la proteína Keap1 que lo mantiene anclado a citoplasma. Este complejo proteico promueve la ubiquitinación de Nrf2 y su degradación en el proteasoma en condiciones basales. Un incremento de ERO causa un cambio conformacional en Keap1, liberando a Nrf2 que después es translocado al núcleo donde se une al ARE en la región promotora, induciendo la expresión de genes detoxificantes y citoprotectores (Modificado de Chen *et al.*, 2014).

1.5. Nrf2 Y β -TRANSDUCINA

La regulación de Nrf2 también puede ser regulada por dos motivos distintos de reconocimiento a β -transducina (β -TrCP) en el dominio Neh6 de Nrf2 (DSGIS y DSAPGS) el cual actúa como un receptor de sustrato para el complejo de ubiquitina ligasa (Skp1-Cul1-Rbx1 / Roc1); esto se ha demostrado en ratones, donde la eliminación de cualquiera de estos dos sitios en Nrf2 disminuyen su ubiquitinación mediada por β -TrCP (Li *et al.*, 2019; Chowdhry *et al.*, 2012). Así también, mediante la modulación de la actividad de GSK3 en alguno de los motivos de interacción de Nrf2 con β -TrCP, se podría aumentar o disminuir su capacidad de actuar como un degrón (porción de una proteína que es importante en la regulación de las tasas de degradación de otras proteínas). Existe evidencia de que GSK3 cataliza la fosforilación del dominio Neh6 en Nrf2, generando un fosfodegrón para el cual se recluta la proteína que contiene repetición de β -transducina del receptor de sustrato (β -TrCP), sugiriendo que el fosfodegrón creado por GSK3 permite la ubiquitilación de Nrf2 por el complejo central E3 Skp1-Cul1-Rbx1 / Roc1 (Chowdhry *et al.*, 2012).

1.6. Nrf2 Y SU REGULACIÓN POR LA CASEÍNA-CINASA 2 (CK2)

Además de los mecanismos comunes de regulación de Nrf2 llevados a cabo por diferentes proteínas; diversos estudios han demostrado que la fosforilación es un elemento crucial en aquellas vías de señalización mediadas por Nrf2, promoviendo la activación y degradación de este factor de transcripción (Apopa *et al.*, 2008). Se ha observado la participación de cinasas citosólicas, incluida la proteína cinasa C (PKC), PI3K/AKT, PERK, MAPK que son capaces de modificar a Nrf2 e implicarse fuertemente en la transcripción mediada por el elemento de respuesta antioxidante (ARE), de sus siglas en inglés "Antioxidant Response Element" (Huang *et al.*, 2000; Bloom & Jaiswal, 2003). En este contexto la fosforilación secuencial de la enzima caseína cinasa 2(CK2) sobre Nrf2 también es importante en su regulación. La calmodulina (CaM) es un sustrato de CK2 y la unión de CaM-CK2 inhibe competitivamente la actividad de CK2. Estas observaciones han derivado en la propuesta de un sistema de control adicional para la respuesta antioxidante celular en el que la unión CaM-Ca²⁺, influye en la actividad de CK2 que, a su vez, promueve la activación y degradación de Nrf2 (Pi *et al.*, 2007).

1.7. LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 COMO TERAPIA DIRIGIDA EN EL DAÑO RENAL CRÓNICO

El estrés oxidante y la inflamación se consideran la principal causa del desarrollo y la progresión del daño renal crónico (DRC) (Nezu *et al.*, 2017; Nezu & Suzuki, 2020). Diversos estudios experimentales han implicado a las especies reactivas de oxígeno (ERO) como mediadores primarios en la patogénesis del daño renal producido por procesos isquémicos y tóxicos. Datos experimentales obtenidos de ratones con insuficiencia renal aguda (IRA) han mostrado que el daño se expande del túbulo renal a la médula y a la corteza, provocando inflamación y la muerte de las células tubulares. En contraste, el aumento de la actividad de Nrf2 en los túbulos renales disminuye el daño relacionado con la insuficiencia renal aguda y previene la progresión de ésta (Nezu *et al.*, 2017).

La mayoría de los diagnósticos para personas con DRC no es nada alentador. Las estrategias para abordar este problema son cada vez menos eficientes pues los tratamientos consisten en diálisis o trasplante de riñón que, aparte de ser costosos, frecuentemente son ineficaces. Es por ello, que la interacción Keap1-Nrf2 se ha propuesto como un blanco terapéutico para controlar el DRC. Se han reportado una gran cantidad de genes involucrados en la respuesta antioxidante e inflamatoria, por lo que diversos mecanismos de transducción de señales que regulan dichas respuestas han atraído la atención para desarrollar terapias dirigidas. Por ello, se ha tratado de encontrar y diseñar, mediante técnicas bioquímicas y computacionales, moléculas que puedan servir como activadores de Nrf2 con alta especificidad. En este contexto, se está investigando activamente el diseño de péptidos y moléculas orgánicas sintéticas de bajo peso molecular con capacidad para intercalarse en la zona de interacción

entre Keap1 y Nrf2 (Bertrand *et al.*, 2015). La inhibición específica de la interacción entre Keap1 y Nrf2 daría lugar a la translocación al núcleo de Nrf2 y la activación de la respuesta antioxidante, permitiendo coadyuvar en procesos inflamatorios de personas con DRC y en otras enfermedades que cursan con inflamación crónica. En este contexto, el estudio de posibles alternativas para mejorar la expresión de Nrf2 en células de riñón es importante para la prevención y el control de la enfermedad renal.

1.8. IMPORTANCIA DE LOS PÉPTIDOS DE DEFENSA DEL HOSPEDERO EN PROCESOS CELULARES

Los péptidos de defensa del hospedero (HDPs) son componentes importantes que modulan los mecanismos de defensa en muchas especies que poseen sistemas inmunitarios complejos, donde promueven la eliminación de patógenos y controlan los efectos contraproducentes de la inflamación excesiva (Bowdish *et al.*, 2005, Scott *et al.*, 2007). Se ha considerado a los HDP como una alternativa al uso de los antibióticos convencionales, para los cuales se ha demostrado una creciente resistencia bacteriana. De ahí que se les considere su utilidad como posibles biofármacos con capacidades antiinfecciosas e inmunomoduladoras (Hancock, 1999). El estudio de la actividad inmunomoduladora de los HDP ha conducido al desarrollo y diseño de péptidos; tal es el caso de los péptidos reguladores de defensa innata (IDR) los cuales cuentan con propiedades antiinfecciosas y antiinflamatorias importantes (Nijnik *et al.*, 2010; Haney *et al.*, 2017). El diseño de los IDR, desarrollados por el Dr. Robert Hancock (The University of British Columbia, Canadá), se basó en las secuencias de aminoácidos de HDP naturales (Hancock, 1999) y se procedió a sintetizarlos químicamente. Los IDR son péptidos catiónicos sintéticos de 12 a 50 residuos de aminoácidos. Algunos ejemplos importantes son IDR-1 (KSRIVPAIPVSSL-NH₂), IDR-1002 (VQRWLIVWRIRK-NH₂), IDR-1018 (VRLIVAVRIWRR-NH₂) e IDR-HH2 (VQLRIRVAVIRA-NH₂) que inducen actividad antimicrobiana indirecta, reducen la respuesta proinflamatoria por medio de mecanismos inmunomoduladores e inhiben la producción de citocinas proinflamatorias inducidas por lipopolisacárido (LPS) (Hancock & Sahl, 2006). En particular, IDR-1 incrementa la respuesta inmunitaria en ratones para eliminar *S. aureus* y *Escherichia coli* de tejidos infectados, aun cuando se ha demostrado multirresistencia a antibióticos como meticilina y vancomicina (Cherkasov *et al.*, 2009). IDR-1018 modula la diferenciación de los macrófagos humanos (Pena *et al.*, 2013), protege a ratones contra infecciones invasivas por *S. aureus*, y su administración parece ser un tratamiento competente para la malaria (Achtman *et al.*, 2012). Además, induce fuertemente la expresión de quimiocinas MCP-1 y MCP-3, y suprime la producción inducida de TNF- α por LPS en células mononucleares periféricas (Wieczorek *et al.*, 2010). IDR-1002 controla eficazmente la inflamación en ratones, al modular selectivamente la expresión de IL-1 β e IL-10 en fibroblastos sinoviales, y reducir la translocación nuclear de NF-kB inducida por TNF- α , IL-1 β y LPS (Turner *et al.*, 2011; Huante *et al.*, 2016). IDR-

HH2 modula la adhesión de neutrófilos, incrementa el efecto de vacunas para el tratamiento de infecciones causadas por *M. tuberculosis*, como se ha propuesto a partir de estudios desarrollados en modelos de ratones *in vivo* e *in vitro* (Niyonsaba *et al.*, 2013; Rivas *et al.*, 2013). Debido a estos antecedentes, los péptidos IDR podrían ser usados como agentes terapéuticos en enfermedades infecciosas y autoinmunitarias, permitiendo dilucidar el mecanismo por el cual los péptidos interactúan con las células del sistema inmunitario y estimulan o inhiben procesos relacionados con la inflamación.

1.9. ANTECEDENTES DE LABORATORIO

Datos obtenidos por Huante *et al.* (2016) en nuestro laboratorio indicaron que en macrófagos de ratón RAW264.7 y en células mononucleares de sangre periférica de humano (PBMC) estimuladas con LPS, el péptido IDR-1002 inhibió la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), y la translocación de NF- κ B al núcleo, donde forma complejo con CBP e induce la expresión de genes pro inflamatorios. IDR-1002 causó la inhibición sobre la actividad de IKK α/β con la subsecuente inhibición de la fosforilación de I κ B α en macrófagos estimulados con TNF α , IL-1 β o LPS. Debido a esto I κ B α permaneció en el citoplasma asociada a NF- κ B, y se bloqueó la expresión de COX-2 dependiente de NF- κ B (Figura 3). IDR-1002 inhibió la translocación al núcleo de NF- κ B, mediante un mecanismo que inhibe a IKK α/β , lo que estabiliza al complejo citosólico I κ B α -NF- κ B.

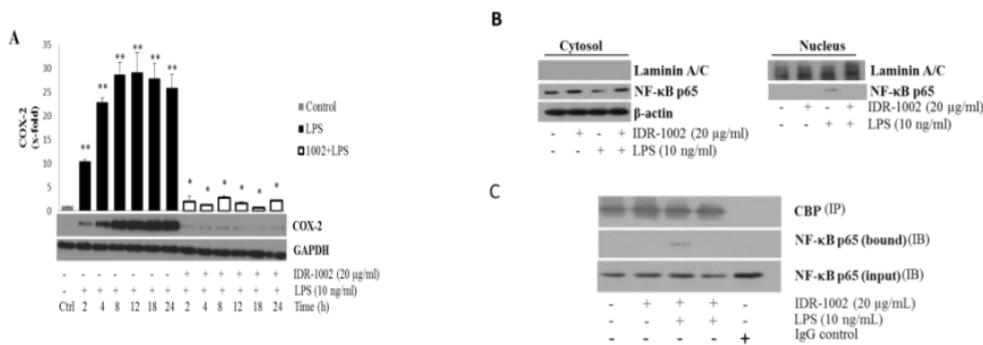


Figura 3. IDR-1002 inhibe la expresión de COX-2 y la translocación al núcleo de NF- κ B en macrófagos RAW264.7. **A)** Los macrófagos control (IDR-1002) y pretratados con IDR-1002 por 1 h se estimularon con LPS por el tiempo indicado. La abundancia relativa de COX-2 se evaluó por Western blot (Wb). **B)** Los macrófagos se trataron con IDR-1002 por 1 h y luego se estimularon con LPS. Se detectó p65 por Wb en las fracciones enriquecidas de proteína nuclear y citosólica. **C)** Detección por Wb de p65 asociado a CBP en macrófagos estimulados con LPS y pretratados con IDR-1002 (Tomada de Huante *et al.*, 2016).

En un trabajo de investigación subsiguiente realizado en el laboratorio por Cristina Maldonado Pichardo (2018), se evaluó si los péptidos IDR-1, IDR-1002, IDR-HH2 y IDR-1018 activaban la translocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2 en células epiteliales de riñón HEK293. Para esto se evaluó la presencia de Nrf2 en núcleo y citosol en células previamente estimuladas con alguno de estos péptidos. La Figura 4 muestra que IDR-1002 y IDR-HH2 activaron fuertemente la translocación de Nrf2 al núcleo, mientras que IDR-1 e IDR-1018 tuvieron un efecto menor.

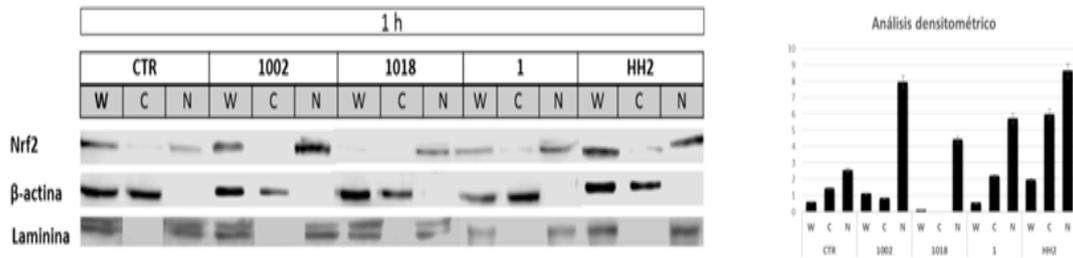


Figura 4. Los péptidos IDR-1002, 1018, 1 y HH2 activan la translocación de Nrf2 al núcleo en células epiteliales HEK293. Las células HEK293 se incubaron con 10 $\mu\text{g/ml}$ de IDR-1002 por 1 h. El panel de la izquierda muestra los resultados de Wb para Nrf2 y el panel de la derecha muestra el análisis densitométrico. La detección de Laminina A/C y β -actina se usó para comprobar la uniformidad de carga en núcleo y citosol, respectivamente (Tomada de Maldonado Pichardo y Baizabal Aguirre 2018, datos no publicados).

Aunque los cuatro péptidos IDR activaron a Nrf2, solo IDR-1002 inhibió la actividad de NF- κ B (Huante *et al.*, 2016). Con la idea de comprender más acerca de los efectos de estos péptidos, así como de identificar las interacciones proteína-péptido más relevantes, se utilizaron métodos computacionales, i.e., modelado molecular y cálculos de *docking*, para identificar posibles interacciones entre IDR-1002 y Nrf2, las cuales explicarían la disminución de las interacciones entre Nrf2 y Keap1 (Figura 3). Se tomó en cuenta que estas biomoléculas catiónicas pueden interactuar con la región aniónica de Nrf2, particularmente con el motivo de baja afinidad DLG del dominio Neh2. Se ha sugerido que la pérdida total de interacciones en este sitio es suficiente para inhibir la degradación de Nrf2 dependiente de Keap1. Los análisis de *docking* sugirieron la formación de posibles complejos entre IDR-1002 y Nrf2 donde las principales interacciones ocurren entre residuos de Nrf2 que son fundamentales en la interacción entre el motivo de baja afinidad DLG de esta proteína y Keap1. La formación de dichos complejos, evitaría la interacción entre Nrf2 y Keap1, lo que promovería la acumulación de Nrf2 y su posterior translocación nuclear.

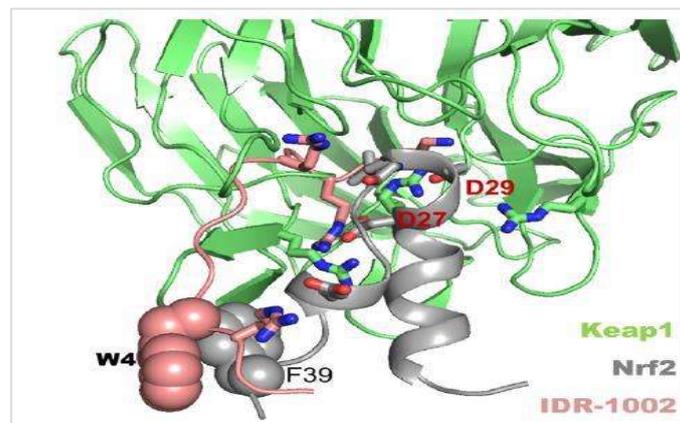


Figura 5. Estructuras superpuestas de los complejos Neh2 de Nrf2 con IDR-1002 y Neh2 de Nrf2 con Keap1. Los modelos de acoplamiento se seleccionaron con base en que la interacción del péptido se localizara en la misma región que ocupa Neh2 de Nrf2 en Keap1. Por lo tanto, las interacciones entre Nrf2/Keap1 y Nrf2/IDR-1002

serían mutuamente excluyentes, lo que es coherente con la hipótesis planteada. Análisis realizado con el programa Rosetta (Pérez-Aguilar, 2018, datos no publicados).

En este estudio experimental y computacional se demostró que principalmente el péptido IDR-1002 indujo la translocación nuclear de Nrf2. La alta afinidad de Nrf2 por IDR-1002 sugiere que este péptido es un buen candidato para estudios *in silico* e *in vitro* que proveerán información más detallada sobre la actividad de Nrf2. Estos descubrimientos sientan las bases para un nuevo estudio experimental y computacional, sobre el efecto de mutantes de IDR-1002 sobre la actividad del factor Nrf2. Las mutaciones de IDR-1002 no solo permitirán demostrar la importancia de diversas posiciones de residuos de aminoácidos en IDR-1002, sino también la naturaleza de los aminoácidos en la secuencia del péptido en la interacción con Nrf2.

2. ANTECEDENTES COMPUTACIONALES

2.1. QUÍMICA COMPUTACIONAL

La química computacional es una rama de la química utilizada para estudiar propiedades fundamentales de átomos, moléculas y reacciones químicas, empleando cálculos de mecánica clásica, mecánica cuántica y termodinámica (Nova y Maseras, 2013; Brás *et al.*, 2015). Las aplicaciones derivadas de la química computacional son muy variadas, algunas de ellas permiten realizar simulaciones para identificar sitios en moléculas como las proteínas que tienen más probabilidades de unirse a un ligando ya sea un fármaco o no (Forli *et al.*, 2016). Otras de ellas permiten explorar los procesos físicos que subyacen a fenómenos como la superconductividad (John *et al.*, 2005), el almacenamiento de energía (Buchenberg *et al.*, 2016), los cambios de fase o estados de transición de una reacción química (Kraka y Cremer, 2010), la corrosión y recientemente la radiactividad (Lan *et al.*, 2017).

El término química computacional fue acuñado por Sidney Fernbach y Abraham Taub en 1970 (Fernbach y Taub, 1970) 43 años después de los inicios que permitieron el desarrollo de esta disciplina.

A continuación, se detalla la evolución de la química computacional desde sus inicios hasta los primeros cálculos que dieron origen a la primera simulación de dinámica molecular de una macromolécula biológica.

En 1927, Heitler y London formularon la teoría que por primera vez permitió el cálculo de las propiedades de enlace de la molécula de hidrógeno basándose en consideraciones de mecánica cuántica y utilizando la ecuación de onda de Schrödinger demostraron la interacción de intercambio magnético de dos átomos de hidrógeno para formar un enlace covalente (Heitler y London, 1927).

Y aunque la mayor parte del desarrollo de la tecnología computacional tuvo su auge en 1940 no fue sino hasta el final de esta y comienzos de la década de los 50's que se llevaron a cabo los primeros cálculos semi-empíricos de orbitales, los cálculos *ab initio* en moléculas diatómicas como N₂ que permitían simplificar la ecuación de Schrödinger asumiendo que los núcleos atómicos permanecen en su lugar durante los cálculos y se desarrolló el método de simulación de Monte Carlo para tratar problemas de fisicoquímica (PediaPress, 2011; Roothaan, 1951; Metropolis y Ulam, 1949). Para 1961, Hendrickson publicaba los primeros resultados de los cálculos de las estabildades conformacionales relativas del ciclohexano (Hendrickson, 1961), Hansch y Fujita en 1964 describían un enfoque nuevo para el análisis de la acción de las drogas: (QSAR), una relación estructura-actividad cuantitativa (Hansch y Fujita, 1964). En 1965 era publicado el método CNDO (*complete neglect of differential overlap*) que consideraba longitudes de enlace, ángulos de enlace, momentos dipolares y los potenciales de ionización (Pople *et al.*, 1965). En 1966 se publicaba un artículo sobre el uso de gráficos moleculares y simulación por computadora (Levinthal, 1966). Para 1969, Levitt y Lifson reportaban el uso de campos de fuerza para refinar estructuras proteicas derivadas de datos experimentales (Levitt y Lifson, 1969). Para la década de los 70's, Norman Allinger en compañía de Sprague desarrollaban el algoritmo de minería-mínimo de primera generación (MM1) que daría origen a un nuevo campo de fuerza (Allinger y Sprague, 1973), Robert Langridge, publicaba un artículo sobre la visualización de estructuras químicas en 3D usando gráficos de computadora (Langridge, 1974), ya para 1977, Crippen hacia un reporte de la distancia geométrica de moléculas para calcular sus conformaciones (Crippen, 1977), en ese mismo año Andrew McCammon, Bruce Gelin y Martin Karplus publicaron el primer estudio de dinámica molecular sobre una proteína (McCammon *et al.*, 1977).

En la actualidad con el continuo avance en el desarrollo de las metodologías computacionales y las mejoras en la velocidad de cómputo, los estudios moleculares derivados de la química computacional tales como: el acoplamiento molecular o la dinámica molecular se han extendiendo a sistemas más grandes, que implican mayores cambios conformacionales y escalas de tiempo más largas permitiéndonos tener una mayor comprensión de la biología detrás de las interacciones moleculares gobernadas por el movimiento de los átomos.

2.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR

En términos precisos el acoplamiento molecular o (docking molecular) es una técnica de modelado molecular por computadora (Prieto *et al.*, 2019). Es útil en la descripción de moléculas pequeñas que interaccionan con hendiduras o bolsillos (*pockets*) de unión de las proteínas diana, permitiendo identificar las posiciones, conformaciones y proyecciones virtuales correctas de los ligandos dentro del sitio de la proteína con la que interactúa permitiendo predecir su afinidad ligando-proteína (Kitchen *et al.*, 2004; Meng *et al.*, 2011). Aunque esta definición solo está orientada en el

ámbito de proteínas la extensión del término también abarca las interacciones moleculares inter e intracelulares o extracelulares llevadas a cabo por ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos (Perez y Tvaroška, 2014; Roy *et al.*, 2015).

El acoplamiento molecular ha sido una importante herramienta en la investigación del descubrimiento de fármacos, su aparente simplicidad y bajo costo han hecho que cada vez se vaya adentrando más en la comunidad científica; sin embargo, cabe resaltar que durante las etapas iniciales de selección de moléculas para el acoplamiento, se suele pasar por alto la mayoría de los compuestos con propiedades bioactivas (Meng *et al.*, 2011; Hollingsworth y Dror, 2018), dado que unas de las mayores implicaciones que dificultan este proceso son realizar el acoplamiento manteniendo rígida la superficie de la proteína que no toma en cuenta los efectos del ajuste inducido dentro del sitio de unión; otra es por una inadecuada metodología de acoplamiento por parte del investigador en la que se genera una predicción estructural errónea que sin saber se toma como válida o por la utilización de moléculas que fueron reportadas en bases de datos cuyas estructuras no fueron bien resueltas y que a la hora de probarse experimentalmente resultan inactivas (Kolb y Irwin, 2009).

Según los tipos de ligandos el acoplamiento se puede clasificar en:

- 1) Acoplamiento proteína-proteína
- 2) Acoplamiento proteína-ligando (molécula pequeña)
- 3) Acoplamiento proteína-ácidos nucleicos

Una metodología adecuada de acoplamiento molecular involucra cuatro características esenciales: 1) ligando, 2) receptor, 3) muestreo y 4) puntuación (*scoring*) (Perez y Tvaroška, 2014). El muestreo implica la posición conformacional (grados de libertad de ligando) y de orientación del ligando dentro del límite del bolsillo de unión del receptor, esto se realiza accediendo a millones de poses distintas. Una función de puntuación selecciona la mejor conformación y orientación del ligando, es decir la mejor pose y clasifica los ligandos en una base de datos (Friesner *et al.*, 2004). Un proyecto de acoplamiento exitoso debe ser capaz de predecir con gran precisión las estructuras de ligandos (predicción de poses) y su predisposición a unirse al receptor (predicción de afinidad) (Bultinck *et al.*, 2003).

El acoplamiento molecular de un sistema proteína-ligando contiene alto número de grados de libertad que aumentan el costo computacional de los cálculos (Salmaso y Moro, 2018). Por tanto, se pueden introducir varias aproximaciones en el estado de flexibilidad en el acoplamiento de moléculas; la primera es la de tratar al ligando y receptor como moléculas rígidas evitando cambios en su conformación (acoplamiento rígido) (Meng *et al.*, 2011), este considera tres grados de libertad de traslación y tres grados de libertad de rotación de la proteína y el ligando, donde cada uno se trata como unidades rígidas separadas (Huang, 2018). En el acoplamiento con ligando flexible, solo el

receptor permanece rígido mientras que ligando permanece flexible. En el acoplamiento flexible ambas moléculas tanto receptor como ligando permanecen flexibles lo cual permite la exploración de diferentes conformaciones estructurales (Haspel *et al.*, 2010).

Aunque el número de trabajos científicos en el campo del acoplamiento molecular han incrementado en los últimos años, las pruebas experimentales que demuestren realmente las poses conformacionales teóricamente predichas son bajas, ya que raramente se presenta evidencia suficiente de si el acoplamiento funciona como debería funcionar, esto provoca una limitante a la hora de comprender y mejorar los métodos de acoplamiento (Kolb y Irwin, 2009).

2.3. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) son un método de simulación por computadora para estudiar los movimientos físicos de átomos y moléculas, predicen cómo cada átomo en una proteína u otro sistema molecular se moverá con el tiempo permitiendo generar una trayectoria de puntos que evolucionan con el tiempo siguiendo la segunda ecuación de Newton, esta predice la posición espacial de cada átomo como función del tiempo (Hollingsworth y Dror, 2018; Aminpour *et al.*, 2019). El enfoque inicial de las proteínas como estructuras relativamente rígidas fue reemplazada por este modelo en el que los movimientos internos y los cambios conformacionales resultantes brindaron un papel fundamental en su función (Karplus y McCammon, 2002). Durante una simulación de dinámica molecular las ecuaciones de movimiento se “integran”, calculando la posición, velocidad (distribución de Maxwell) y fuerzas sobre las partículas en pequeños intervalos de tiempo ($\sim 10^{-15}$ s) donde la fuerza es constante. Una vez que las partículas se mueven a nuevas posiciones se recalculan las velocidades y fuerzas y así sucesivamente hasta el final de la simulación, permitiendo describir la trayectoria de las partículas respecto a el tiempo (Hollingsworth y Dror, 2018). Durante las simulaciones de DM suele usarse uno de los tres conjuntos estadísticos diferentes que existen: el conjunto microcanónico (NVE), el conjunto canónico (NVT) y el conjunto isoterma-isobárico (NPT) (Aminpour *et al.*, 2019), útiles durante el equilibrio del sistema, proceso que implica lograr la temperatura y presión deseadas antes de cambiar al conjunto de volumen constante o energía constante. En estos conjuntos, N representa el número de partículas en el sistema, E la energía, V el volumen y P la presión. Desde el punto de vista de la mecánica estadística, se puede asignar una temperatura al sistema (Aminpour *et al.*, 2019). Bajo estas condiciones la probabilidad de encontrar al sistema en un estado con una energía específica (mínimo local o global) está dado por la distribución de Boltzmann que utiliza los multiplicadores de Lagrange (Toxvaerd, 1993). Para el control de temperatura en el sistema de DM se utilizan diferentes termostatos: el termostato de Langevin, Andersen y el termostato de Nosé-Hoover, siendo el termostato Langevin el más utilizado (Liu *et al.*, 2016; Weinan, y Li, 2008; Braga y Travis, 2005). La DM se

ejecuta típicamente para tiempos en ps (picosegundos) o ns (nanosegundos) (Hollingsworth y Dror, 2018). Los tiempos de simulación suficientemente largos en DM aseguran que el espacio de fase se muestreará bien, asegurando que el proceso se aproxime a las propiedades termodinámicas correspondientes (Hospital *et al.*, 2015).

Las propiedades que se miden con más frecuencia en DM son la energía potencial, la energía cinética, la energía total, la temperatura, la presión, el radio de giro (RG) y la desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) (Baig *et al.*, 2014).

La primera simulación de dinámica molecular de una macromolécula biológica se llevó a cabo en 1977 por McCammon, Gelin y Karplus. La molécula simulada fue el inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI) con una duración de 9.2 ps, los resultados reemplazaron la visión de las proteínas como estructuras relativamente rígidas (McCammon *et al.*, 1977). Durante los 10 años posteriores a la primera simulación, se investigaron simulaciones dinámicas de proteínas, ácidos nucleicos (Brünger *et al.*, 1985), despolarizaciones fluorescentes de residuos de triptófano (Ichiye y Karplus, 1983), efecto de solventes y temperatura sobre la estructura y la dinámica de las proteínas (Frauenfelder *et al.*, 1979); se investigó también el refinamiento estructural de moléculas obtenidas por cristalografía de rayos-X y resonancia magnética nuclear (RMN) (Artymiuk *et al.*, 1979; Brünger *et al.*, 1987), la flexibilidad proteica, la flexibilidad del tRNA, la configuración de entropía y las posiciones que marcaban un sitio activo abierto o cerrado de una proteína (modo bisagra) para la entrada o salida de un ligando (Case y Karplus, 1979). El impacto de las simulaciones de dinámica molecular (MD) en la biología molecular y el descubrimiento de fármacos han aumentado su atractivo, por lo cual se ha expandido drásticamente en los últimos años; además dadas la accesibilidad, precisión y velocidad de datos estructurales experimentales han demostrado ser una valiosa herramienta para decodificar los mecanismos funcionales de las proteínas y otras biomoléculas útiles en el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas; así como en el diseño y optimización de moléculas pequeñas como péptidos inhibidores proteína-proteína (Hollingsworth y Dror, 2018). Para muchas áreas de la investigación, las simulaciones de dinámica molecular, se han ido estableciendo como un modelo utilizado a la par junto con el acoplamiento molecular y datos experimentales de laboratorio, siendo el banco de datos de proteínas (PDB) y la *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB, www.rcsb.org), uno de los recursos más importantes para las simulaciones de DM que pone a disposición estructuras macromoleculares biológicas 3D determinadas experimentalmente como proteínas y ácidos nucleicos.

2.4. CAMPOS DE FUERZA

Las fuerzas en una simulación de DM se calculan mediante un modelo conocido como campo de fuerza (*Force Field*, FF) proveniente de la Mecánica Molecular (MM), que se ajusta a los resultados derivados de la Mecánica Cuántica (MQ) (Hollingsworth y Dror, 2018; Lindorff-Larsen *et al.*, 2012). En DM la energía se expresa como suma de diversos términos que en esencia describen las diferentes distorsiones geométricas o trayectorias que la molécula puede experimentar entre sus átomos enlazados, así como las interacciones no enlazantes, para ello suelen usarse potenciales de mecánica molecular para calcular las fuerzas entre las partículas y sus potenciales (González, 2011).

Los métodos de Mecánica Molecular plantean una función analítica basada en parámetros ajustables que, para una configuración nuclear dada, permite devolver la energía del sistema. A hora bien, estos parámetros se obtienen ajustándolos a datos experimentales como resonancia magnética nuclear (NMR), difracción de rayos-X, espectroscopia infrarroja o de cálculos de mecánica cuántica *ab initio* o semi-empíricos (Hollingsworth y Dror, 2018; Gonzales, 2011). Una vez que los parámetros han sido determinados, las moléculas que participaran en la simulación deben definirse o considerarse como un conjunto de átomos siguiendo dos aproximaciones fundamentales, la primera es la de Born-Oppenheimer en la que las posiciones atómicas son propagadas por fuerzas que se calculan en el estado fundamental electrónico auto consistente en cada instante para la disposición de los iones (Niklasson *et al.*, 2006) y la segunda es la que establece que los enlaces entre átomos deben describirse utilizando un potencial armónico dado por la ley de Hooke, en la que se consideran dichos enlaces como resortes (Adcock y McCammon, 2006).

En DM la mayoría de los campos de fuerza utilizados se interpretan en términos de cuatro tipos de interacciones inter e intra moleculares.

En las fuerzas de enlace: Las distancias y ángulos de enlace se modelan usando resortes simples (funciones de energía cuadrática). La forma funcional de la energía diédrica es muy variable, por lo que los ángulos diédricos (las rotaciones sobre un enlace) se modelan utilizando una función sinusoidal. Se pueden agregar términos torsionales impropios adicionales para imponer la planaridad de anillos aromáticos, y se pueden usar "términos cruzados" para describir el acoplamiento de diferentes variables internas, como ángulos y longitudes de enlace (Bultinck *et al.*, 2003).

En las fuerzas de no enlacen: las interacciones repulsivas o atractivas (electrostáticas) se modelan usando la ley de Coulomb (Davis y McCammon, 1990) y las interacciones de van der Waals se modelan usando el potencial de Lennard-Jones (Zimmerman *et al.*, 2011).

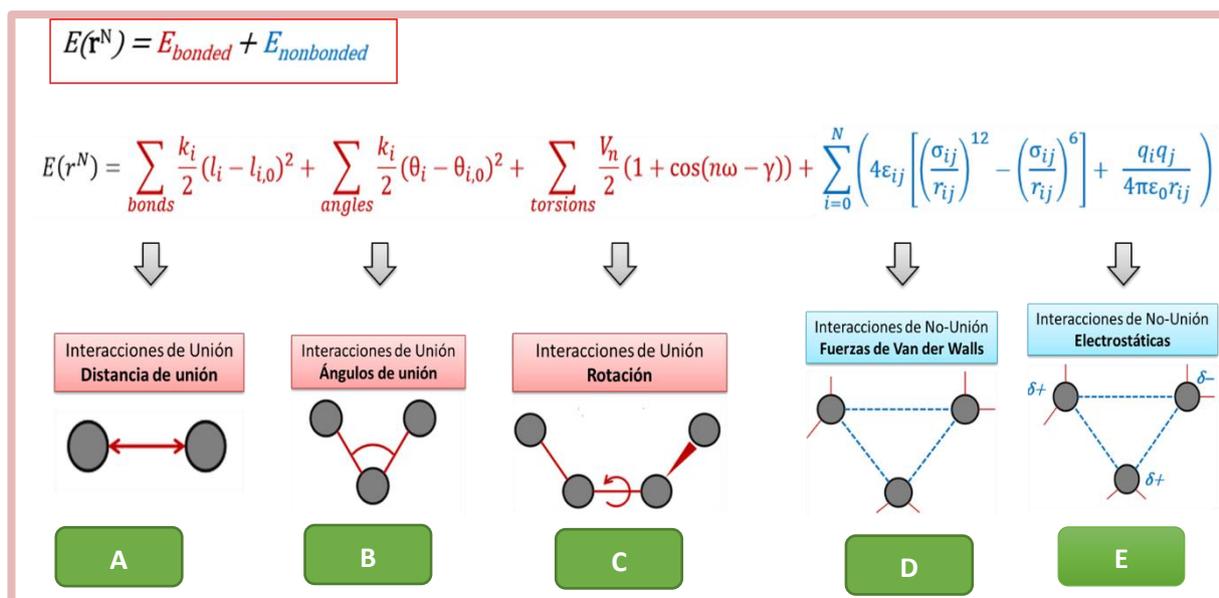


Figura 6. Un modelo clásico de campo de fuerza (FF). (A) Observamos el estiramiento o contracción de un par de átomos enlazados (modelado por un resorte simple), (B) Estiramiento y contracción del ángulo de enlace (modelado por un resorte simple), (C) Rotaciones de ángulo diedro (modelado por una función sinusoidal), (D) Interacciones de Van der Waals (modeladas por el potencial de Lennard-Jones) y (E) Interacciones electrostáticas (modelado por la ley de Coulomb). (A-C) son causadas por interacciones entre átomos que son químicamente enlazados entre sí mediante interacciones fuertes (enlaces covalentes), mientras que (D-E) son causadas por interacciones entre átomos que no están enlazados químicamente (modificada de Aminpour *et al.*, 2019).

La energía potencial dada por las interacciones descritas anteriormente, depende del tipo de campo de fuerza que se emplee. Existen varios tipos de campos de fuerza como: MM1-MM4, CHARMM, XPLOR, OPLS, GROMOS, AMOEBA y AMBER (Mobley *et al.*, 2018; Kaminski y Jorgensen, 1996; Smith *et al.*, 2015; Schwieters *et al.*, 2018; Starovoytov *et al.*, 2014). Haciendo énfasis en el campo de fuerza CHARMM, este tiene parámetros ampliamente optimizados y validados para proteínas, lípidos y ligandos similares a fármacos (Zhu *et al.*, 2012), por otro lado, aunque los campos de fuerza han mejorado bastante durante los últimos años, siguen siendo imperfectos y las aproximaciones derivadas de estos deben ser consideradas al analizar los resultados de la simulación.

3. JUSTIFICACIÓN

El factor de transcripción Nrf2 es fundamental para disminuir la concentración de ERO producidas en la respuesta inflamatoria causada por daño tisular y, debido al estrés oxidante. La importancia de Nrf2 en el control de la inflamación, ha provocado innumerables estudios enfocados en el desarrollo y la aplicación de moléculas con actividad inhibitoria de la interacción entre Keap1 y Nrf2. Tales moléculas funcionarían como anti-inflamatorias al activar Nrf2 y, como consecuencia, regularían

la expresión de genes antioxidantes. Estos inhibidores podrían utilizarse como coadyuvantes para el tratamiento o prevención de varios padecimientos que cursan con inflamación como los son la enfermedad renal crónica, el cáncer, la diabetes, la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, por mencionar algunas.

Los estudios experimentales y computacionales realizados previamente en nuestro laboratorio indicaron que el péptido IDR-1002 es capaz de activar la translocación al núcleo de Nrf2, mediante su unión con Neh2, la región de interacción con Keap1. De los estudios *in silico*, los análisis de docking sugieren que IDR-1002 se une con el motivo de baja afinidad DLG de Nrf2 de tal manera que compite e inhibe la interacción de Keap1 y Nrf2. Aunado a esto, resultados preliminares de simulaciones atomísticas de dinámica molecular sugieren que los aminoácidos de IDR-1002 que contribuyen principalmente a esta unión son los residuos **R3**, **R9** y **R11**. Por lo tanto, la idea de esta propuesta es evaluar tanto en experimentos *in vitro* como *in silico* la importancia relativa de cada uno de estos aminoácidos de IDR-1002 en la interacción con Nrf2. Los resultados que se obtengan sentarían las bases para posteriores estudios enfocados en el desarrollo de una segunda generación de péptidos capaces de activar una respuesta antioxidante mediada por Nrf2, pero con diversas propiedades nuevas, e.g., mayor afinidad, menor costo, mayor resistencia a la degradación, por mencionar algunas.

4. HIPÓTESIS:

La mutación puntual del péptido IDR-1002 en la posición **R9** tiene una actividad menor sobre la translocación nuclear de Nrf2 en células HEK293.

5. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto de las mutaciones puntuales del péptido IDR-1002 en la posición **R9** sobre la actividad del factor de transcripción Nrf2 en células HEK293.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Utilizando métodos computacionales diseñar las mutaciones **R3**, **R9** y **R11** del péptido IDR-1002 y probar las consecuencias funcionales en su interacción con Nrf2.
2. Evaluar experimentalmente el efecto de la mutación puntual del péptido IDR-1002 en la posición **R9** sobre la translocación de Nrf2 al núcleo.

3. Evaluar el efecto de Nrf2 nuclear sobre la expresión de HO-1 en citoplasma de células estimuladas con el péptido IDR-1002 y la mutación puntual IDR-1002-R9A.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIAL BIOLÓGICO

7.1.1. PÉPTIDO IDR-1002

El IDR-1002 es un péptido sintético catiónico que se encuentra amidado en el carboxilo C-terminal. Este péptido fue gentilmente donado por el Dr. Robert EW Hancock (The University of British Columbia, Vancouver, Canadá) por acuerdo de colaboración con el Dr. Víctor M. Baizabal Aguirre. El aminoácido R⁹, tomando como referencia para la numeración a la Val¹ en la secuencia de IDR-1002, se cambió por el residuo de alanina, **R9A** (V¹Q²R³W⁴L⁵I⁶V⁷W⁸R⁹I¹⁰R¹¹K¹²-NH₂). La mutante puntual R9A del péptido IDR-1002 fue sintetizada por la empresa GenScript, USA.

7.1.2. LÍNEA CELULAR HEK 293

Los experimentos se realizaron en la línea celular HEK 293 proveniente de células embrionarias de riñón humano (HEK, *Human Embryonic Kidney*). Estas células están transformadas con ADN adenoviral tipo 5 (Graham *et al.*, 1977) y cuentan con el gen adenoviral E1 integrado en su genoma, por lo que permite la replicación viral de adenovirus recombinante, aunque carezca de la región E1. Las células se cultivaron en medio DMEM Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (SIGMA No. Cat. D-5523) más 20 mM de HEPES según datos del fabricante. El medio de cultivo se clasificó como incompleto sin suero fetal bovino (SFB, Equitech-Bio) o completo cuando fue suplementado con 10% de SFB, 1% de glutamina (GIBCO No. catálogo 35050-061) y 1% de antibiótico (penicilina y estreptomycin) (GIBCO No. catálogo 15240-062). La línea celular HEK 293 se mantuvo en medio DMEM completo y se incubó a 37 °C con atmósfera de 5% CO₂, y 95% aire hasta una confluencia del 85-90%: Para los experimentos las células en pase 7-8, solo se mantuvieron en medio DMEM incompleto durante 2 hrs.

8. METODOLOGÍA TEÓRICO-COMPUTACIONAL

8.1. GENERACIÓN *IN SILICO* DE LAS MUTANTES DE IDR-1002

Estudios previos en nuestro laboratorio sugirieron la relevancia de los residuos **R3**, **R9** y **R11** como los principales determinantes en la formación de este complejo. En particular, decidimos analizar

la función de R9 con base en la última conformación obtenida a partir de la simulación de Nrf2 y el péptido IDR-1002 para realizar las siguientes mutaciones *i) R3A*, *ii) R9A* y *iii) R11A*. Las consecuencias en la interacción de cada péptido mutado en la interacción con Nrf2 serán estudiadas mediante simulaciones atomísticas de dinámica molecular, similares a las realizadas con la secuencia original de IDR-1002. El análisis estructural de dichas simulaciones nos permitió identificar la relevancia de estas mutaciones en los mecanismos de formación del complejo Nrf2/IDR-1002. Nuestro análisis sugiere que la posición R9 del péptido IDR-1002 podría jugar un papel central en la formación del complejo con Nrf2, por lo que **R9A** fue seleccionada para ser analizada utilizando ensayos experimentales.

8.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LAS MUTANTES DE IDR-1002 CON Nrf2.

Los cálculos de acoplamiento molecular entre Nrf2 y las diferentes mutantes de IDR-1002 se realizaron con el programa *PIPER-FlexPepDock*, que es parte del programa *Rosetta Suite* (<http://piperfpd.furmanlab.cs.huji.ac.il/>). El protocolo de este programa utiliza únicamente información de la estructura primaria del péptido (su secuencia de aminoácidos) lo que reduce posibles sesgos asociados con estructuras iniciales del péptido provisto por parte del usuario.

8.3. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR DE LAS MUTANTES DE IDR-1002 CON Nrf2 (JMPA)

Simulaciones de Dinámica Molecular.

Las interacciones entre las mutantes del péptido IDR-1002 y Nrf2 fueron evaluadas utilizando métodos computacionales, específicamente, se realizaron simulaciones atomísticas de dinámica molecular. Dichas simulaciones están basadas en conceptos de fisicoquímica y termodinámica estadística que nos ofrecieron información a nivel atómico-molecular sobre las posibles interacciones entre las dos moléculas. La información obtenida se analizó y se contrastó con los resultados experimentales y nuevas hipótesis fueron examinadas y evaluadas. El sistema molecular consistió en el motivo de baja afinidad (DLG) de Nrf2 con código de identificación de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) (PDBID: 3WN7.pdb; contiene el archivo de coordenadas atómicas de la proteína), localizado en el centro de una caja de moléculas de agua donde además se incluyó el péptido IDR-1002 de acuerdo a los resultados de los cálculos de acoplamiento molecular (modelos 7 y 10). Los grupos ionizables de las cadenas laterales tanto de la proteína como del péptido, corresponden a su estado más probable a un pH de 7. Todo el sistema (compuesto por alrededor de 21,000 átomos) fue neutralizado con iones de sodio y cloro. Con la finalidad de emular el ambiente fisiológico nativo, el sistema fue

simulado a una presión de 1 atm y a una temperatura de 37 °C utilizando el ensamble isoterma-isobárico (NPT), durante un periodo de 1000 ns (500 millones de pasos). Procedimientos similares se llevaron a cabo para cada una de las mutantes **R3A**, **R9A** y **R11A**, aunque en este caso, la estructura inicial correspondió al estado final de la simulación de la secuencia original del péptido. El campo de fuerza utilizado fue CHARMM36, el cual contiene la información necesaria sobre la manera en que las diferentes entidades moleculares interactúan. Las simulaciones se realizaron utilizando infraestructura local (laboratorio de Química Teórica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla) y utilizando parte del tiempo de cómputo otorgado en el Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS).

9. ESTUDIO BIOQUÍMICO-EXPERIMENTAL

9.1. CARACTERÍSTICAS DE LA LÍNEA CELULAR HEK293

La línea celular HEK 293 proviene de células embrionarias de riñón humano (HEK, *Human Embryonic Kidney*) son una línea celular humana hipotripleide. Estas células están transformadas con ADN adenoviral tipo 5 (Ad5) (Graham *et al.*, 1977). Además de utilizarse para aislar mutantes de Ad5 en los intervalos de hospedadores con transformación defectuosa, también han sido utilizadas para titular adenovirus humanos (Gueret *et al.*, 2002). La incorporación de genes adenovirales en el genoma de esta célula permitió la eficiencia en la producción exacerbada de proteínas recombinantes a partir de vectores plásmidos que incluyen la región promotora del Citomegalovirus (CMV). Son una línea celular de rápida duplicación (36 horas), semi-adherente y resistentes. Útiles tanto en la expresión transitoria como estable de genes, son fáciles de transfectar y pueden producir grandes cantidades de proteínas recombinantes (Thomas & Smart, 2005). Suelen utilizarse en la investigación del cáncer, inflamación, el desarrollo de vacunas, la producción de proteínas como factores de transcripción, en estudio de transducción de señales y estudios de interacción de proteínas, así como en pruebas de fármacos y en la deorfanzación de receptores, proceso por el cual se descubren nuevos ligandos de gran interés farmacológico (Dumont *et al.*, 2016, Raghubeer *et al.*, 2017 y Panieri & Saso, 2019).

9.2. ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS HEK293 CON EL PÉPTIDO IDR 1002 NATIVO Y MUTANTES.

Los experimentos se realizaron con células confluentes al 85-90% en cajas de 6 pozos (Corning™) en medio DMEM incompleto (sin suero, glutamina y antibiótico). Después de 4 h de incubación se agregó 10 o 50 µg/mL del péptido IDR-1002 nativo y mutado. Las células se incubaron por 1 h y se recuperó la proteína. La proteína se cuantificó por la técnica de Bradford con albúmina sérica de bovino como referencia. Como control negativo, las células HEK293 se incubaron sin estímulo.

9.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

La proteína de células HEK293 control y tratadas con 0 o 50µg/mL de IDR-1002 nativo o mutante R9A se obtuvo lavando primero 2 veces las células con 1 mL de PBS frío (4°C). Después, a cada pozo se le añadieron 80 µl de buffer de lisis a 4°C (20 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-930, 10 mM de pirofosfato de sodio, 50 mM de fluoruro de sodio y 1 mM de ortovanadato de sodio) suplementado con 1X de inhibidor de proteasas (Roche No. de catálogo 04693116001) e inhibidor de fosfatasas (Sigma No. de catálogo P-5726). La proteína se recuperó raspando cada pozo con una espátula de plástico, y los 80 µL se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. El lisado obtenido se centrifugó a 4,500 xg por 20 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se conservó en congelación a -20° C hasta su uso.

9.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL, CITOPLÁSMICA Y NUCLEAR

Se procedió de acuerdo con el protocolo REAP (Rápido, Eficiente y Práctico) descrito por Suzuki et al. (2010) para separar la proteína total, citoplasmática y nuclear de las células tratadas con 0 o 50 µg/mL, 7 o 50 µM del péptido IDR-1002. Las células contenidas en cajas de Petri (Corning 30 x 10 mm, No. de catálogo 430165) y a una confluencia de 85 a 90% se colocaron en hielo y se lavaron con PBS frío; la proteína se recuperó con 1 mL de PBS frío, con ayuda de una espátula de plástico. El homogenado se depositó en un tubo de 1.5 mL, se centrifugó a 10000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 segundos y después se retiró el sobrenadante, se agregó a 4°C 1 mL de PBS-NP40 al 0.1% (10 mL de PBS 10X, 1 mL de NP40 al 10%, 89 mL de agua) y se homogeneizó. Una alícuota de 200 µL se transfirió a otro tubo y se etiquetó como total (T). Los 800 µL restantes del homogenado se centrifugaron a un pulso de 10000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 segundos. Del sobrenadante (SN) se tomó una alícuota de 200 µL y se etiquetó como citoplasma (C); el sobrenadante restante se desechó y se añadió 1 mL de PBS-NP40 0.1% a 4°C a los 600 µL restantes de la muestra principal. Se centrifugó a 10000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 segundos y nuevamente el sobrenadante se desechó. La pastilla se re-suspendió en 80 µL de PBS-NP40 0.1% frío y se etiquetó como núcleo (N). Las fracciones correspondientes al total (T) y el núcleo (N) se sonicaron 15 s, en 3 pulsos de 5 s cada uno (On) y con 7 segundos de descanso (Off) y 25% de amplitud en un sonicador (Qsonica, LLC, modelo Q125, 20Khz; Newtown, U.S.A.). Las muestras fueron resuspendidas en PBS-NP40 y se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso. A todas las muestras se les adicionó inhibidor de proteasas y fosfatasas al 2% (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor, Roche-Switzerland).

9.5. DETECCIÓN DE Nrf2 POR ENSAYO TIPO WESTERN BLOT

La abundancia relativa de Nrf2 en células control y estimuladas con el péptido IDR-1002 se determinó por ensayos tipo Western blot (WB). Para esto, se procedió primero a separar las proteínas de las diferentes fracciones (total, nuclear y citoplasmática) por electroforesis en geles de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida, 37.5-1) desnaturalizantes SDS-PAGE al 10% a voltaje bajo de 80 V hasta que las proteínas llegaron a la interfase entre gel condensador y gel separador, después de este lapso se incrementó el voltaje a 200 V en buffer que contenía 25 mM de Tris, 192 mM de glicina y 0.05% SDS a 4°C por 1 h. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTAN-PERKIN ELMER No. de catálogo NBA085C001EA) a corriente constante de 250 mA por 1 h en amortiguador de transferencia frío (25 mM de Tris, 192 mM de glicina y 15% de metanol) y en agitación. Al término de la transferencia, las membranas se colocaron en una solución de bloqueo compuesta de leche descremada (Bio-Rad) al 5% p/v en TTBS (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9% NaCl p/v y 0.1 % de Tween-20) en agitación constante por 1 h. Para detectar la abundancia relativa de Nrf2 en los extractos totales y enriquecidos en proteína citoplasmática y nuclear, se utilizó el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-Nrf2 (Santa Cruz, sc-722) a una dilución 1:300 en solución de bloqueo. Como control de carga se detectó β -actina con anticuerpo policlonal de ratón (Santa Cruz, sc-47778) a una dilución 1:2500 en solución de bloqueo.

Para observar la actividad de Nrf2 sobre la expresión de genes antioxidantes en el núcleo celular se detectó la proteína hemo oxigenasa-1 y con el anticuerpo primario de conejo (Enzo Life, ADI-OSA-150-D) a una dilución 1:1000 y como anticuerpo secundario se usó el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004). Para los extractos obtenidos por fraccionamiento celular se usó también el anticuerpo primario de cabra anti-laminina A/C (Santa Cruz, sc6215) a una dilución 1:100. Las membranas que contienen las proteínas separadas se incubaron en agitación constante a 4°C con los anticuerpos primarios durante toda la noche (18 h). Las membranas se lavaron con agua destilada y TTBS a temperatura ambiente (3 lavados de 10 min c/u). Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios a una dilución de 1:1000. Para detectar Nrf2 se usó el anticuerpo de cabra anti conejo (Santa Cruz, IgG-HRP sc-2004); para β -actina el anticuerpo IgG de cabra anti-IgG-HRP de ratón (Santa Cruz sc-2031) y para laminina A/C el anticuerpo IgG de conejo anti-IgG -HRP de cabra (Santa Cruz, sc-2768). Las membranas se lavaron con agua destilada y TTBS (3 lavados de 10 min c/u) y para generar la señal de quimioluminiscencia se utilizó el kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Milipore Billerica, MA, USA). La quimioluminiscencia se detectó con ayuda del equipo LI-COR (modelo 3600, BioSciences, USA) donde se exponen las membranas por 12 min.

9.6. CUANTIFICACIÓN DE Nrf2 POR ELISA.

Se midieron las concentraciones de Nrf2 en núcleo por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas comúnmente conocido como ELISA (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Seattle, Washington, United States) con un kit de la empresa Life Span BioSciences, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, los estándares y las muestras se colocaron en pocillos recubiertos con el anticuerpo específico de Nrf2 humano. El Nrf2 presente en la muestra se unió al anticuerpo inmovilizado en los pocillos durante un tiempo de incubación de 1 hora a 37 °C. Después, se agregaron concentraciones similares de anticuerpo biotinilado y se dejó incubar la placa del ensayo ELISA a 37 °C por 1 hora; posteriormente, se realizaron lavados para retirar el anticuerpo no unido, se agregó estreptavidina conjugada con HRP a la placa, y se realizó la adición de sustrato de tetrametil benzidina (TMB). La intensidad del color azul se observó en proporción a la cantidad de Nrf2 unido. La solución de “stop” cambió el color azul a amarillo y la absorbancia se midió a 450 nm en un espectrofotómetro marca (iMark de BIO-RAD).

9.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las señales obtenidas de los ensayos tipo Western Blot se analizaron por densitometría en el programa Image J versión 1.50i (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Las unidades densitométricas se calcularon mediante la obtención del cociente que relaciona los valores numéricos de la intensidad de la banda correspondiente a la proteína de interés entre la intensidad de la banda utilizada como control de carga. En todos los casos se consideró P menor de 0.05 como significativo.

10. RESULTADOS

10.1. ANÁLISIS TEÓRICO COMPUTACIONAL

10.1.1. INTERACCIÓN DE IDR-1002 CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2 POR ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Los cálculos de acoplamiento molecular “proteína/péptido” entre Nrf2 y el péptido IDR-1002 se llevaron a cabo usando el programa *PIPER-FlexPepDock* de *Rosetta Suite* (<https://www.rosettacommons.org/docs/latest/applicationdocumentation/docking/flex-pep-dock/>) que permite cierta flexibilidad en la proteína durante el acoplamiento de péptidos. Se utilizó la estructura del dominio Neh2 de Nrf2 que contiene el motivo DLG (código de acceso PDB 3WN7), para acoplar la secuencia del péptido IDR-1002, VQRWLIVWRIRK-NH2. Los cálculos de acoplamiento produjeron varios resultados y después de su análisis, dos posibles modelos del complejo proteína/péptido fueron seleccionados para su posterior estudio, el modelo 7 y el modelo 10; esta selección se basó en la orientación de la conformación del péptido hacia el mismo sitio donde DLG se

une a Keap1 y en la presencia de interacción de IDR-1002 con DLG similares a las interacciones observadas en el complejo Nrf2-Keap1.

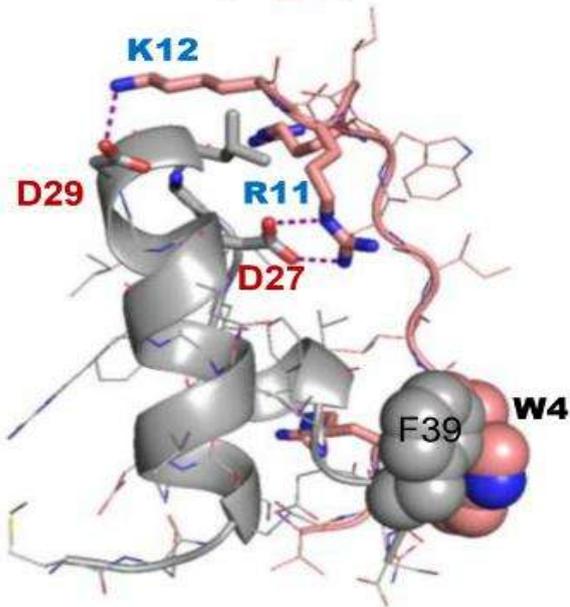
El análisis detallado del modelo 7 (**Figura 8**) indicó que hay una interacción directa de tipo puente salino, entre el residuo R9 del péptido IDR-1002 (R9IDR) y residuo D27 de Nrf2 (D27Nrf2), así como entre R9IDR y Q26Nrf2. Además, el residuo I10IDR interacciona con L30Nrf2 que se encuentra en la parte central del motivo DLG. Por otra parte, W4IDR formó interacciones aromáticas con el residuo F39Nrf2. Las interacciones de dos residuos básicos R11IDR y K12IDR, son particularmente interesantes porque, a pesar de que no están interaccionando directamente con el dominio Neh2, están cerca del residuo D29Nrf2 del motivo DLG, por lo que se sugiere podrían formar interacciones de tipo puente salido con dicho residuo.

El análisis detallado del modelo 10 (**Figura 7**) indicó que existe una interacción directa entre el residuo R11IDR y D27Nrf2 mediante un puente salino. Además, se formó una interacción directa entre K12IDR y D29Nrf2 que forma parte del motivo DLG. El otro residuo básico R9IDR, formó interacciones con el grupo CO de la cadena principal del residuo L30Nrf2 y en menor grado con G31Nrf2 (ambos del motivo DLG). La cadena lateral de L30Nrf2 se colocó entre una bolsa hidrofóbica formada por los grupos CH2 de R9IDR y K12IDR. Además, observamos interacciones aromáticas entre W4IDR y F39Nrf2. Por último, también se formó una interacción de tipo puente salino entre R3IDR y E35Nrf2.

El estudio por acoplamiento molecular de la interacción del péptido IDR-1002 con el motivo DLG del factor de transcripción Nrf2, permitió analizar los residuos más relevantes que participan en la interacción IDR-Neh2 y que promueven la activación de Nrf2, a partir de los dos modelos del complejo seleccionados (modelos 7 y 10). Además, estos resultados sugieren que los residuos R3, R9 y R11 de IDR son importantes en la interacción con Nrf2 (**Figuras 7 y 8**).

Nrf2 (Neh2 domain-DLG motif)

MDLIDILWRQDIDLGVSRVDFES

**IDR-1002**

VQRWLIWVRIRKKG

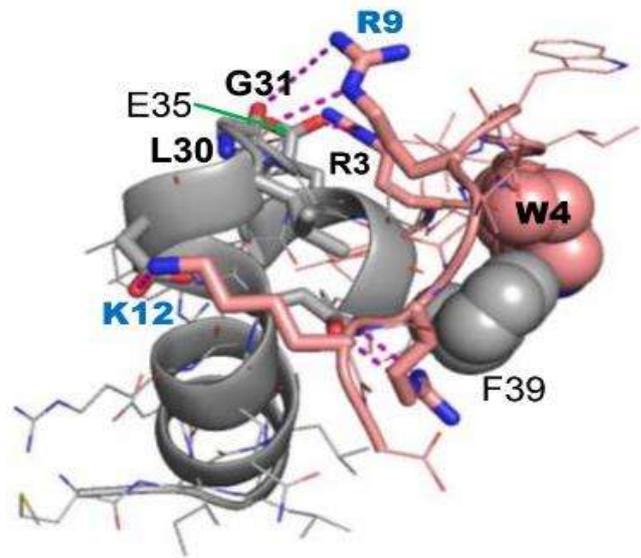


Figura 7. Interacción del motivo DLG del dominio Neh2 de Nrf2 (gris) con IDR-1002 (rosa) modelo 10. En el panel de la izquierda existe una interacción directa entre R11 y D27 mediante puente salino. Además, existe una interacción directa entre K12 y D29 en el motivo DLG. En el panel de la derecha, el otro residuo básico R9, forma interacciones con el grupo principal CO de L30 y posiblemente, G31 (ambos del motivo DLG). La cadena lateral de L30 se coloca entre una bolsa hidrófoba formada por los grupos CH2 de R9 y K12. Además, hay interacciones aromáticas entre F39 y W4. Por último, también se forma una interacción de puente salino entre R3 y E35.

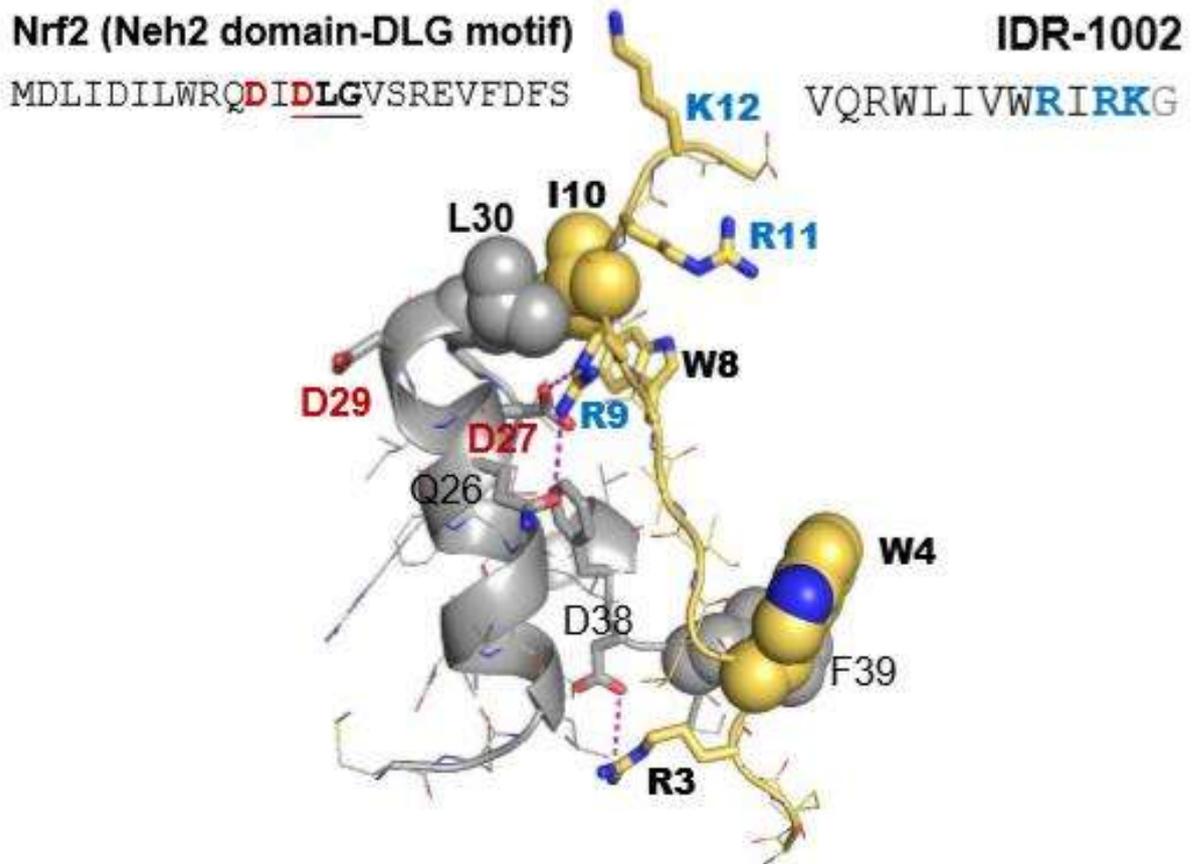


Figura 8. Interacción del motivo DLG del dominio Neh2 de Nrf2 (gris) con IDR-1002 (amarillo) modelo 7. Puede observarse una interacción directa entre R9 y D27, mediante un puente salino; también, R9 interactúa con Q26. Además, I10 interactúa con L30 del motivo DLG. Por otra parte, W4 forma interacciones aromáticas con F39. Los otros dos residuos básicos, R11 y K12, son particularmente interesantes porque, a pesar de que no están interactuando con el dominio Neh2, están cerca del D29 del motivo DLG.

10.2. INTERACCIÓN DE IDR-1002 MODELO 7 Y MODELO 10 CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2 POR DINÁMICA MOLECULAR

Con la idea de validar los modelos 7 y 10 generados por acoplamiento molecular y corroborar si las interacciones establecidas entre el péptido IDR-1002 y el dominio Neh2 de Nrf2 se mantenían a lo largo del tiempo, se decidió realizar simulaciones atómicas de dinámica molecular por un periodo de 1000 ns (500 millones de pasos), tomando como la conformación inicial del complejo los dos modelos seleccionados en el acoplamiento molecular. Dichas simulaciones están basadas en conceptos de fisicoquímica y termodinámica estadística que predicen las conformaciones más estables y de forma concomitante, las interacciones estables entre las diferentes entidades que lo conforman. El sistema molecular consistió en el motivo de baja afinidad (DLG) de Neh2-Nrf2 (PDB ID: 3WN7.pdb) localizado en el centro de una caja de moléculas de agua, junto con el péptido nativo IDR-1002. Los grupos ionizables de las cadenas laterales, tanto de la proteína como de los péptidos, corresponden a su

estado más probable a un pH de 7. Al centro de cada gráfico de simulación por DM se encuentra una barra de colores auxiliar que va del rojo al azul y nos permite seguir los cambios conformacionales que experimenta el péptido IDR-1002 durante el transcurso de la simulación. El color azul indica el tiempo inicial de la simulación y el rojo indica el término de la simulación.

Del análisis de las trayectorias obtenidas a partir de las simulaciones de dinámica molecular se puede observar que, aunque los complejos del modelo 10 y 7 son estructuralmente diferentes, la interacción R9^{IDR} y D27^{Nrf2} se mantiene en ambos sistemas (**Figuras 9-10**). Por otro lado, las interacciones que involucran residuos localizados en la región N-terminal del péptido, E35^{Nrf2} y R3^{IDR}, D38^{Nrf2} y V1^{IDR} (+NH3) solo son importantes en el Modelo 10, **Figura 10**; a su vez las interacciones que involucran residuos básicos como R11^{IDR} sólo son importantes en el Modelo 7 representadas por D27^{Nrf2} y R11^{IDR}, **Figura 9**. Del análisis también podemos concluir que no se ha observado participación del residuo K12^{IDR} en ninguna de las simulaciones.

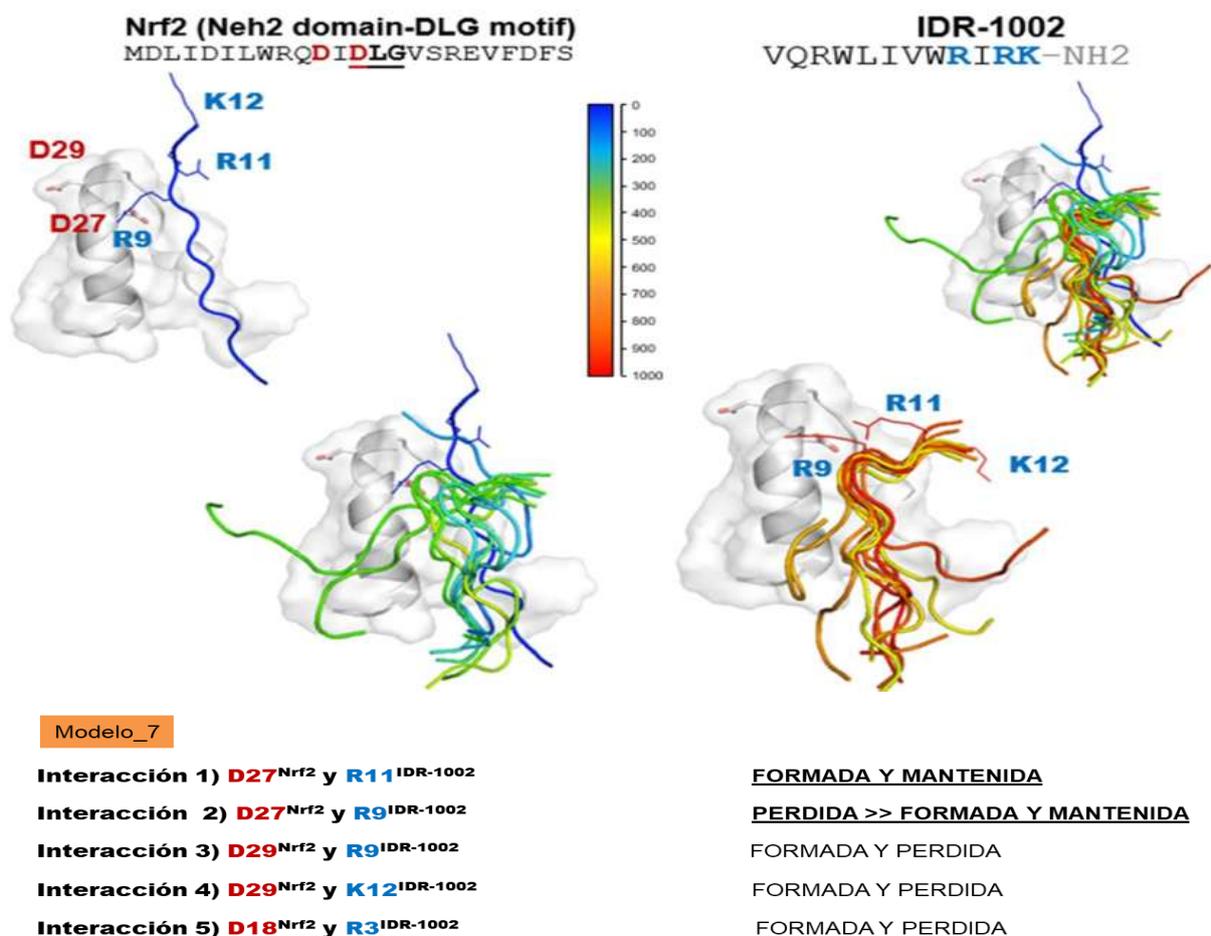
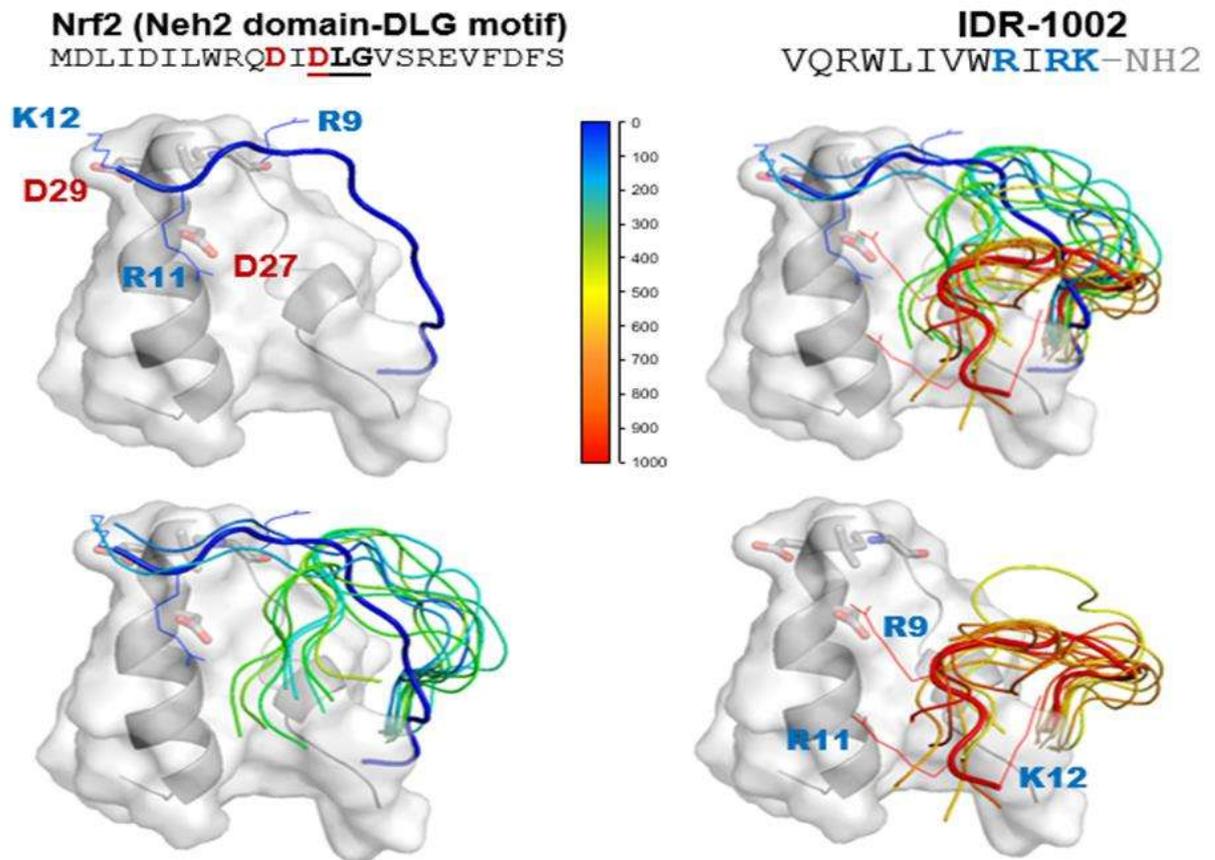


Figura 9. Principales interacciones entre IDR-1002 y Neh2 de Nrf2 del modelo 7 generadas por simulación atómica de dinámica molecular, durante un periodo de 1000 ns. El motivo DLG de Neh2-Nrf2 se representa

en gris y el péptido IDR-1002 en diferentes colores para poder seguir los cambios conformacionales que experimenta durante el transcurso de la simulación.



Modelo_10

Interacción 1) D27^{Nrf2} y R11^{IDR-1002}	PERDIDA
Interacción 2) E35^{Nrf2} y R3^{IDR-1002}	<u>FORMADA Y MANTENIDA</u>
Interacción 3) D38^{Nrf2} y V1(+NH3)^{IDR-1002}	<u>FORMADA Y MANTENIDA</u>
Interacción 4) D27^{Nrf2} y R9^{IDR-1002}	<u>FORMADA Y MANTENIDA</u>
Interacción 5) D27^{Nrf2} y W8^{IDR-1002}	<u>FORMADA Y MANTENIDA</u>

Figura 10. Principales interacciones entre IDR-1002 y Neh2 de Nrf2 del modelo 10 generadas por simulación atómica de dinámica molecular, durante un periodo de 1000 ns. El motivo DLG de Neh2-Nrf2 se representa en gris y el péptido IDR-1002 en diferentes colores para poder seguir los cambios conformacionales que experimenta durante el transcurso de la simulación.

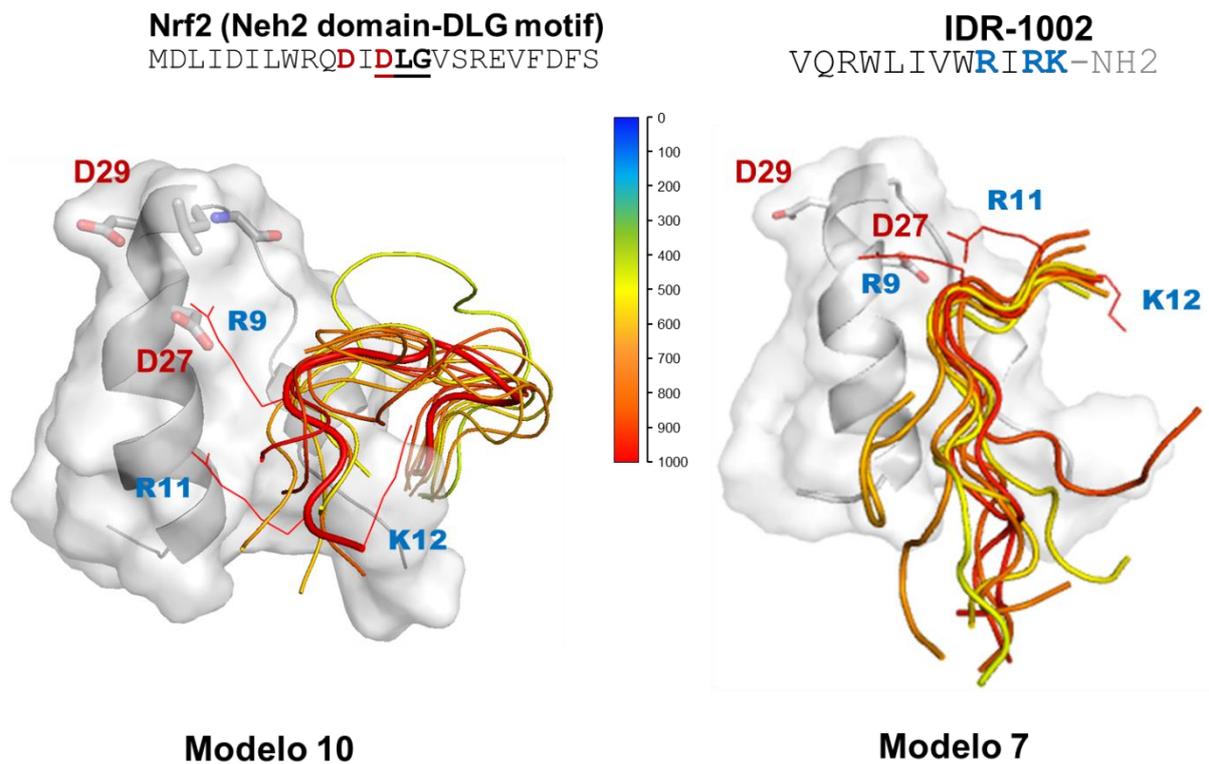


Figura 11. Comparación de los modelos 10 y 7 obtenidos por simulaciones atomísticas de dinámica molecular entre IDR-1002 y Neh2-Nrf2. Es posible observar que, durante la fase final de la simulación, el péptido IDR-1002 adquiere una conformación semi-estable sobre cierta región de Neh2, por interacciones electrostáticas.

10.3. INTERACCIÓN DE IDR-1002 CON IDR-1002-R3A, IDR-1002-R9A E IDR-1002-R11A CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2 POR DINÁMICA MOLECULAR

Las trayectorias obtenidas a partir de las simulaciones de dinámica molecular entre IDR-1002 y Neh2, permitió dilucidar la importancia de los residuos de IDR-1002 más relevantes en la formación de un complejo estable, R3, R9 y R11. Nuestros resultados proponen que dichos residuos juegan un papel central en la interacción de IDR-1002 Nrf2 y su eventual activación ya que contribuyen en gran medida a la estabilización de la pose molecular que el péptido adopta cuando interactúa con esta región del factor de transcripción. Con la idea de contrastar aún más la importancia de estos residuos de aminoácidos en la interacción Nrf2-IDR-1002 y determinar su relevancia en las conformaciones

adoptados por el péptido, se tomó como punto de partida la configuración del sistema adoptada al final de simulación de los modelos 7 y 10 y se realizó una mutación puntual in silico de la posición 9 del péptido, **R9A**. A continuación, se realizó una simulación de dinámica molecular de sistema por 1000 ns para evaluar las repercusiones de la mutación introducida. En el caso del modelo 7, dicho protocolo se realizó además para la mutación puntual R11A mientras que en el caso del modelo 10, se incluyó la mutación puntual R3A.

Así, el nuevo sistema molecular consistió en el motivo de baja afinidad (DLG) de Neh2-Nrf2 (PDB ID: 3WN7.pdb) localizado en el centro de una caja de moléculas de agua, junto con cada una de las mutantes del péptido IDR-1002. Los grupos ionizables de las cadenas laterales, tanto de la proteína como de los péptidos, corresponden a su estado más probable a un pH de 7. Todo el sistema, compuesto por alrededor de 21,000 átomos, fue neutralizado con iones de sodio y cloro.

El análisis de las simulaciones muestra que no hay péptidos mutantes que se separen por completo del dominio Neh2 durante el tiempo que duró la simulación. Como parte de los resultados de dinámica molecular entre IDR-1002-R9A con Neh2 podemos observar que la mutación R9A causó un reordenamiento de la conformación en el modelo 7 y la formación de interacciones estables entre D29Nrf2 y los residuos básicos del nuevo péptido IDR-1002-R9A, R3IDR-R9A o R11IDR-R9A (**Figura 11**). De acuerdo con el modelo 10, la mutación R9A causó un cambio mayor en la unión del péptido con Nrf2, perdiéndose la interacción establecida previamente con D27Nrf2 y R9IDR del péptido original IDR-1002 observadas durante las simulaciones de dinámica molecular (**Figura 12**). De los resultados de dinámica molecular entre IDR-1002-R11A con Nrf2 podemos observar que la mutación R11A causó un reordenamiento de la conformación en el modelo 7 y la formación de interacciones estables entre D27Nrf2 y R11IDR-R11A, D29Nrf2 y R9IDR-R11A, ambos residuos pertenecientes al nuevo péptido IDR-1002-R11A. Dichos cambios se asemejan a los observados en los resultados obtenidos para el modelo 10 del péptido nativo (**Figuras 13,14 y 15**). Cuando se introduce la mutación R3A (modelo 10), no solo se debilitan las interacciones en la región N-terminal del péptido, sino que se incrementa el carácter helicoidal alrededor del sitio de la mutación.

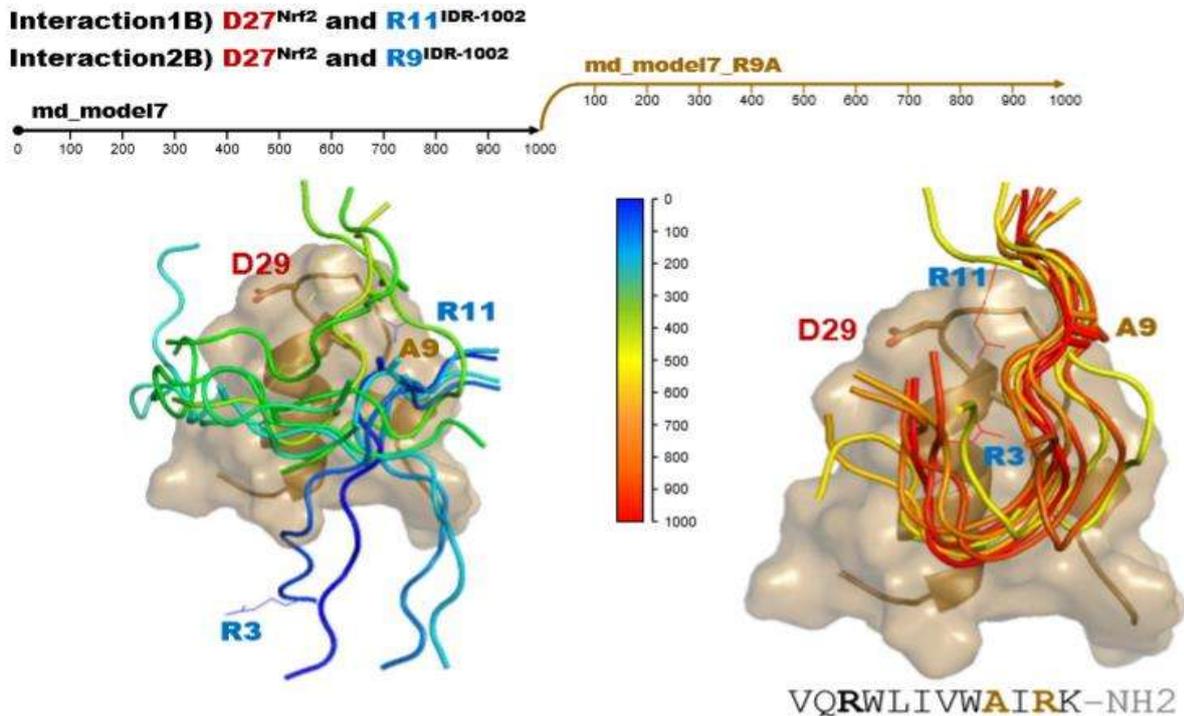


Figura 12. Interacción ente IDR-1002-R9A y Neh2 del modelo 7. El reordenamiento de las interacciones relativamente estables es dado por R3 y R11 que participan en la interacción con D29. También se observa que no hay formación de estructura helicoidal secundaria.

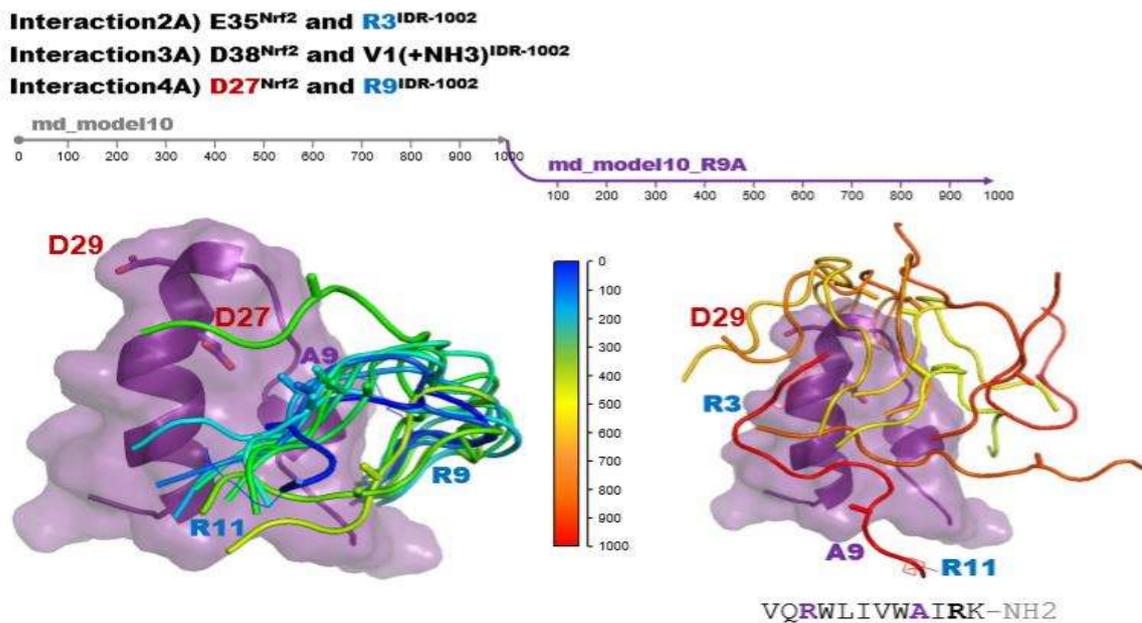


Figura 13. Interacción entre IDR-1002-R9A y Neh2 del modelo 10. Existe pérdida significativa de interacciones, las cuales al principio de la simulación estaban dadas entre D27 y R9. También se aprecia que no hay formación de estructura secundaria helicoidal.

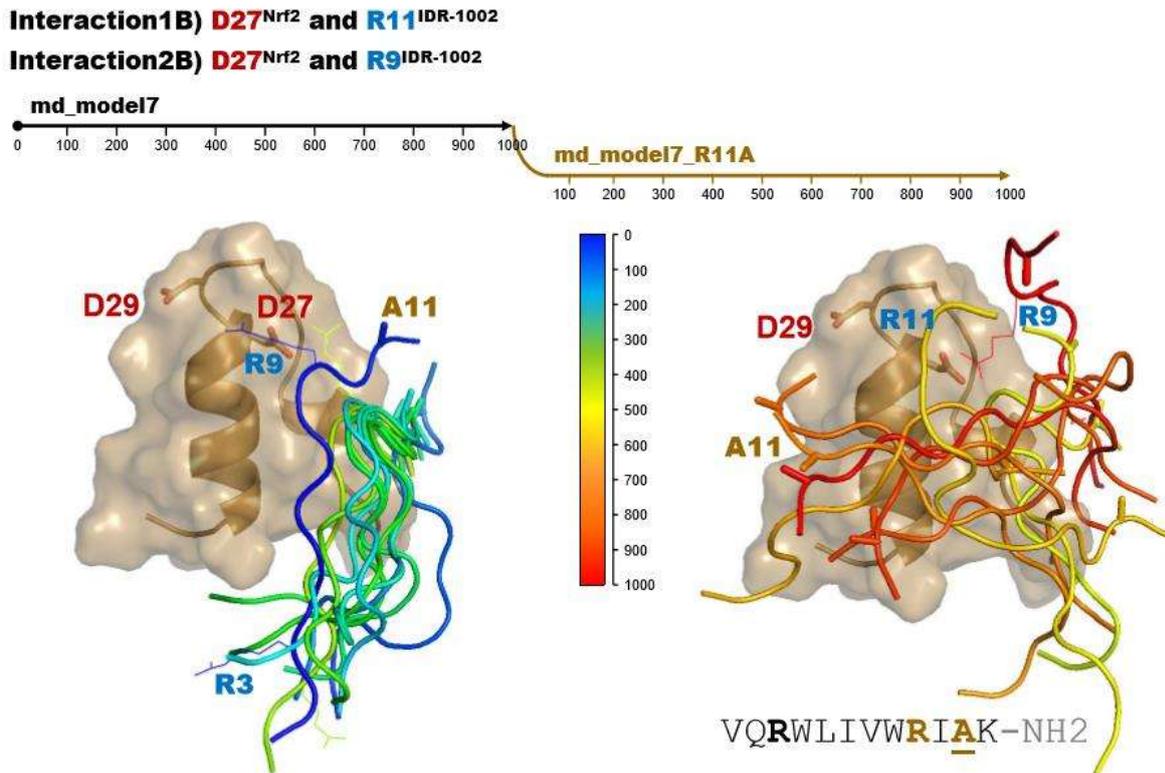


Figura 14. Interacción entre IDR-1002-R11A y Neh2 del modelo 7. Se observa un rearrreglo conformacional de la estructura del péptido en la segunda mitad de la simulación. Nuevas interacciones se observan al final de la simulación entre R3, R9 V1(+NH₃) que son similares a las interacciones establecidas y observadas de la simulación del modelo 10.

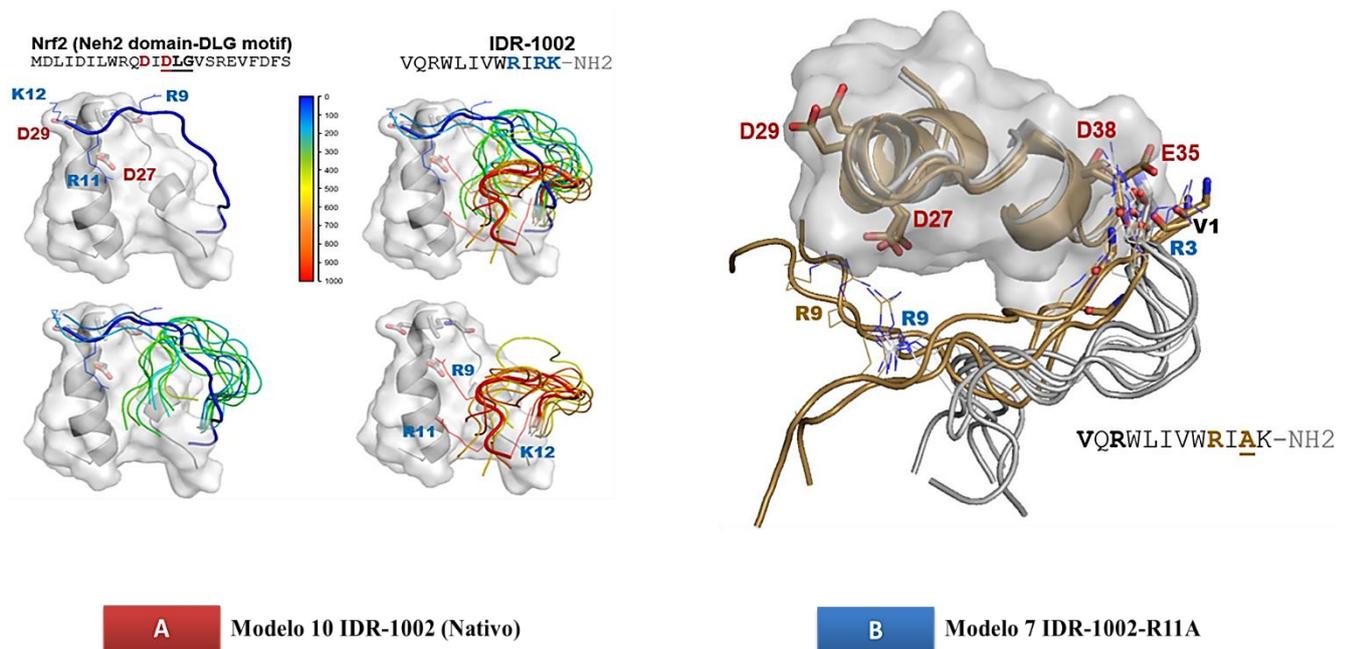


Figura 15. Comparación del modelo 10 del péptido nativo (Panel A) y modelo 7 (IDR-1002-R11A) (Panel B). Nuevas interacciones se observan al final de la simulación de la mutante IDR-1002-R11A del modelo 7 entre R3, R9 y V1(+NH₃) que asemejan a las interacciones establecidas y observadas de las simulaciones del modelo 10. Las interacciones son entre R3 de IDR-1002 y E35 de Nrf2, D38 de Nrf2 y V1 (+NH₃) de IDR-1002 así como R9 de IDR-1002 y D27 de Nrf2.

10.3.1. ANÁLISIS DE ESTRUCTURA (RMSD Y RADIO DE GIRO)

Una de las propiedades estructurales que se puede obtener a partir de las trayectorias de las simulaciones de dinámica molecular es la Desviación Cuadrática Media o por sus siglas en inglés RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Los valores de RMSD provén una medida de la similitud entre dos estructuras y generalmente se calcula como la distancia promedio entre los átomos (usualmente los átomos de la cadena principal o solo los carbonos alfa de la misma) de las proteínas superpuestas. Por lo tanto, cuanto menor sea el valor de RMSD, mayor similitud tendrán las dos estructuras que se comparen (Kufareva y Abagyan, 2015). En términos precisos es una métrica útil al evaluar la distancia entre la pose nativa y la pose predicha, dada una superposición de estructuras de receptores de proteínas (Bell y Zhang, 2019).

La RMSD se encuentra dada como:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}.$$

Donde δ_i es la distancia entre el átomo i y una coordenada de referencia.

En este trabajo se realizaron simulaciones comparativas de dinámica molecular para estudiar las diferencias en la dinámica de los péptidos nativos en la interacción con Nrf2 (Modelo 7 y Modelo 10). El valor de RMSD se determinó para los átomos de la cadena principal del péptido IDR-1002. Al analizar las gráficas de RMSD del modelo 7 resulta evidente que el péptido nativo IDR-1002 permanece cerca en su conformación inicial hasta ~300 ns, manteniendo un valor de RMSD para toda la cadena principal de aproximadamente 4.5 Å con respecto a su configuración inicial, indicando que el péptido ha alcanzado una posición estable donde varios de sus residuos pueden estar interactuando con Nrf2 (Figura 16). Para los residuos más importantes de IDR-1002 en la interacción con Nrf2, nosotros analizamos la evolución de la distancia entre dos átomos como una medida de las interacciones entre los residuos. Podemos observar que la distancia entre el carbono CG (posición gamma) de D27^{Nrf2} y el

átomo de carbono de CE (posición épsilon) de R11^{IDR-1002} muestra algunas fluctuaciones importantes al inicio de la simulación, pero se mantiene alrededor de 4.2 Å por el resto de la trayectoria, lo que implica que la interacción carga-carga entre estos dos residuos es estable en el periodo de tiempo simulado (**Figura 17 A**). Del mismo modo encontramos que las distancias entre el carbono CG de D27^{Nrf2} y el átomo de carbono CE de R9^{IDR-1002} al inicio de la simulación se mantiene oscilando en valores altos de distancia indicando que no han formado interacción; sin embargo, cuando se alcanza un tiempo de simulación de ~150 ns, se genera una interacción por puente salino entre estos dos residuos manteniéndose hasta el final del tiempo de simulación con valor de distancia aproximado de 4.2 Å (**Figura 17 B**). Por otro lado, podemos observar que, en un inicio, las distancias entre CG de D29^{Nrf2} y CE de R9^{IDR-1002} se muestran fluctuando considerablemente. Sin embargo, esta interacción se estabiliza indicando un cambio en su orientación al momento que se alcanzan los 250 ns de simulación con una distancia <4 Å que se mantiene hasta los 450 ns, tiempo en el que nuevamente ocurre una fluctuación y la interacción carga-carga se pierde (**Figura 17 C**). Para las distancias entre el carbono CG de D29^{Nrf2} y el átomo de carbono CE de K12^{IDR-1002}, esta interacción no está formada al inicio de la simulación, aunque se forma a los pocos nanosegundos. Así mismo, la interacción se pierde al poco tiempo de simulación, y se mantiene fluctuando durante toda la simulación en intervalos de distancia considerables (12-23 Å aproximadamente). El comportamiento de ambos residuos indica que, a pesar de no formarse una interacción, las conformaciones adoptadas por sus residuos se mantienen orientadas (**Figura 17 D**). De la misma manera para las distancias que describen el comportamiento de los átomos entre el carbono CG de D18^{Nrf2} y el átomo de carbono CE de R3^{IDR-1002} encontramos que su distancia se acorta a los pocos nanosegundos de simulación, alcanzando aproximadamente 4 Å, indicando la formación de una interacción carga-carga. No obstante, cuando se avanza a los 300 ns de simulación, ocurre una fluctuación y la distancia aumenta rápidamente con valores desde 17 hasta 25 Å aproximadamente. Consecutivamente, la distancia entre ambos residuos se mantiene fluctuando en intervalos bastante amplios, indicando que IDR-1002 no logra mantener la orientación de su residuo hacia el sitio de interacción con el residuo de Nrf2 conforme avanza la simulación (**Figura 17 E**). De este análisis de resultados se puede deducir que los gráficos de distancia que representan los residuos con las interacciones más estables en el modelo 7 corresponden a D27^{Nrf2}-R9^{IDR-1002} y D27^{Nrf2}-R11^{IDR-1002} con 4.2 Å y 4 Å, respectivamente.

El análisis de los valores de RMSD de IDR-1002 del modelo 10 (**Figura 18 A**), mostraron que en el intervalo de 0-100 ns la conformación inicial del péptido tiene un RMSD de 2 Å, lo que sugiere estabilidad conformacional; sin embargo, la desviación aumenta a 4.5 Å después de los 100 ns y se mantiene hasta 1000 ns, indicando que el péptido ha alcanzado una posición estable donde varios de sus residuos pueden estar interactuando con Nrf2. La distancia de interacción entre el carbono CG de D27^{Nrf2} y el átomo de carbono CE de R11^{IDR-1002} muestra valores de 4 Å, lo que indica que durante los primeros 600 ns se mantiene la estabilidad estructural; sin embargo, esta estabilidad se pierde después

de este tiempo con valores de distancia entre 12 a 14 Å, indicando un cambio conformacional acentuado e inestabilidad de la interacción (**Figura 19 A**). Por su parte la distancia de interacción entre el carbono CG de D27^{Nrf2} y el átomo de carbono CE de R9^{IDR-1002} mostró valores de distancia oscilatorios altos al inicio de la simulación, hasta que se alcanzó los 550 ns aproximadamente. Posteriormente, la interacción toma lugar y se mantiene hasta que finaliza la dinámica con valores de 4 Å (**Figura 19 B**). En lo que respecta a la interacción E35^{Nrf2}-R3^{IDR-1002} podemos observar que la distancia entre el carbono CD (posición delta) de E35^{Nrf2} y el átomo de carbono de CE de R3^{IDR-1002} muestra algunas fluctuaciones importantes al inicio de la simulación, pero se mantiene alrededor de 4.5 Å por el resto de la trayectoria, lo que implica que la interacción carga-carga entre estos dos residuos es estable en el periodo de tiempo simulado (**Figura 19 C**). Para la interacción D27^{Nrf2}-W8^{IDR-1002} los valores en la distancia rondan los 10-12 Å durante los primeros 600 ns. Esto indica inestabilidad conformacional que sin embargo logra ser contrarrestada durante los últimos 400 ns de la simulación, donde los valores en la distancia descienden a ~4 Å observándose estabilidad estructural en la interacción que se mantiene hasta el final de la trayectoria (**Figura 19 D**). Finalmente, la distancia de interacción entre el grupo amino N-terminal del péptido cargado positivamente en la posición de la V1+(NH3) y el carbono CG D38^{Nrf2} muestran que rápidamente se establece una interacción carga-carga entre estos residuos que se mantiene a lo largo de la simulación con valores de ~4 Å (**Figura 19 E**).

Si comparamos los valores de RMSD del modelo 7 y del modelo 10 observamos que ambos comparten un RMSD promedio de 4.5 Å y un conjunto particular de interacciones muy importantes (D27^{Nrf2}-R9^{IDR-1002}, D27^{Nrf2}-R11^{IDR-1002} y E35^{Nrf2}-R3^{IDR-1002}) con pequeñas variaciones en sus distancias de interacción. Estas variaciones en los valores medios de distancia permitieron concluir que una mutación en los residuos más relevantes podría afectar el comportamiento dinámico del péptido nativo IDR-1002, lo que proporcionó una base adecuada para futuros análisis en la interacción con Nrf2. Por otra parte, los valores de radio de giro indican la compactación estructural espacial de la proteína. Esto puede interpretarse como el momento en que la proteína adopta la energía más baja, que refleja la mayor compactación y estabilidad de la misma. A mayor fluctuación de los valores de radio de giro, menos estable es la proteína en ese punto del tiempo; por lo tanto, el radio de giro es importante durante los estudios comparativos. El análisis del radio de giro del modelo 10 proporcionó una idea de las dimensiones generales del péptido. La **Figura 18 B** ilustra el gráfico de radio de giro de átomos de la cadena principal de IDR-1002 para el modelo 10 durante un tiempo de simulación de 1000 ns a 300 K; en esta figura podemos observar que al inicio de la simulación y hasta ~100 ns la estabilidad es baja por las altas fluctuaciones que presenta siendo de alrededor de 9.5 Å; sin embargo, a tiempos entre 100 ns a 1000 ns la estabilidad mejora y se mantiene con un promedio aproximado de 7.5 Å, indicando que la estructura ha alcanzado una conformación compacta y estable en su interacción con Nrf2.

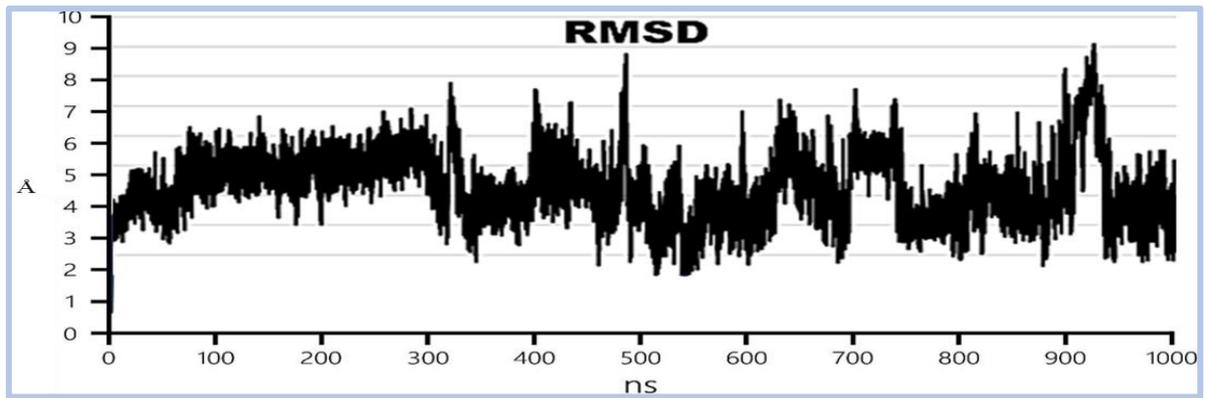


Figura 16. Valores de RMSD con respecto al tiempo de simulación de DM del Modelo 7. Podemos observar los valores promedio de la desviación cuadrática media de ~ 4.5 Å, indicando estabilidad estructural en la dinámica de las interacciones de IDR-1002 con Nrf2. Se observa que en el intervalo que va de 0-550 ns el péptido explora diferentes orientaciones. Sin embargo, posteriormente encuentra una orientación estable y se mantiene así hasta que finaliza la simulación.

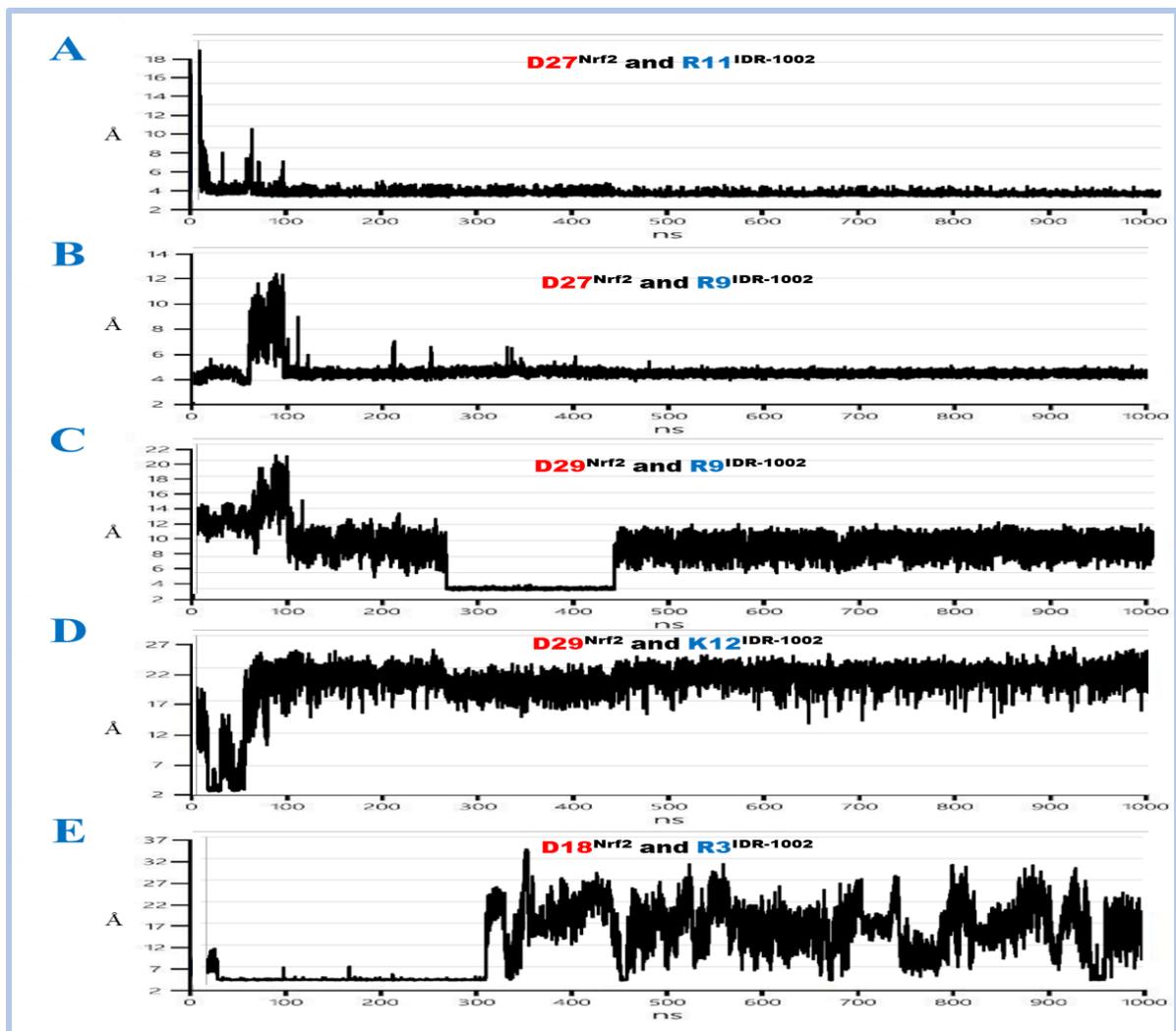


Figura 17. Análisis de distancias de las interacciones de la simulación de DM del Modelo 7. En A se muestran los valores de distancia de la interacción D27^{Nrf2} y R11^{IDR-1002} que ronda un valor aproximado de 4.5 Å. En B se muestra la interacción D27^{Nrf2} y R9^{IDR-1002} con valores de distancia de 4.2 Å. En C, D y E se muestran los valores de distancia de las interacciones D29^{Nrf2}-R9^{IDR-1002}, D29^{Nrf2}-K12^{IDR-1002} y D18^{Nrf2}-R3^{IDR-1002} respectivamente con valores que rondan los ~4, 12 y 17 Å en el tiempo de simulación donde adquieren gran estabilización.

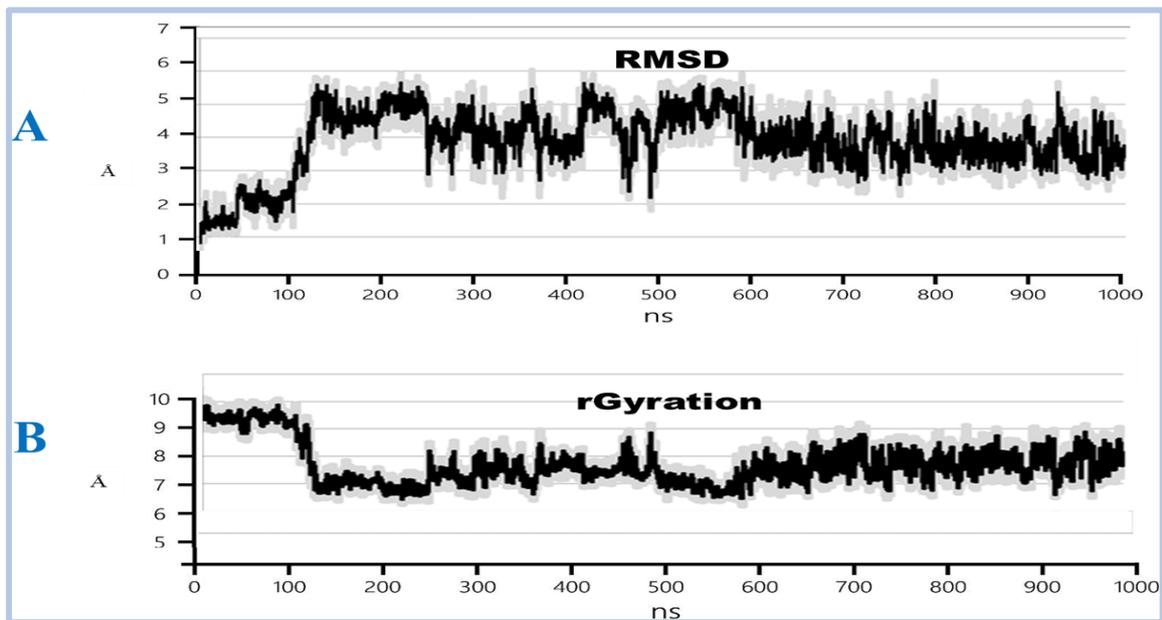


Figura 18. Valores de RMSD y radio de giro (rGyration) con respecto al tiempo de simulación de DM del Modelo 10. En A podemos observar los valores promedio de la desviación cuadrática media de ~4.5 Å, indicando estabilidad estructural al igual que como lo indica el radio de giro en B, donde podemos observar que a partir de los 600 ns del tiempo de simulación, el valor promedio se mantiene cerca de los 8 Å, indicando que la proteína ha alcanzado una conformación compacta.

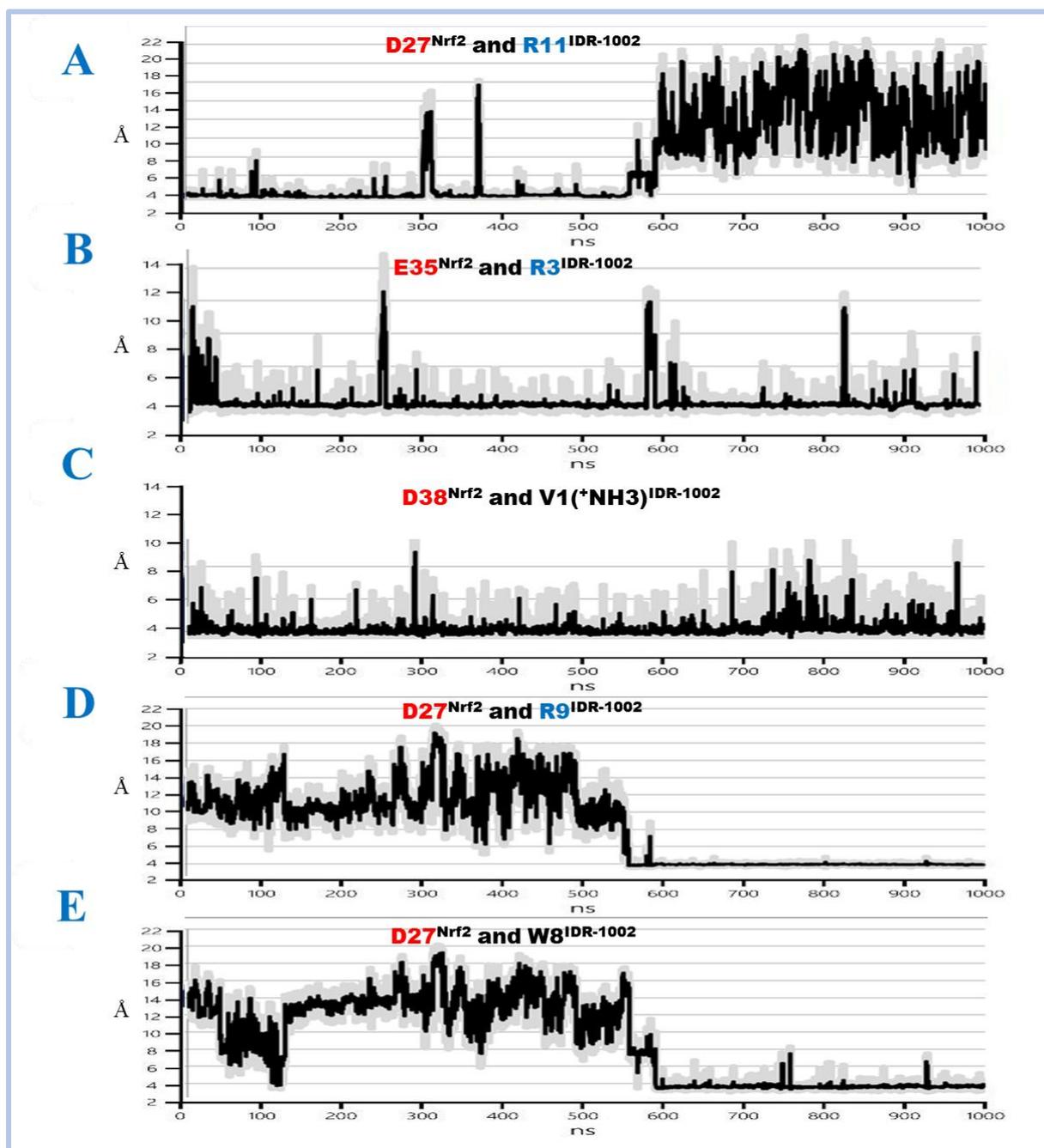


Figura 19. Análisis de distancias de las interacciones de la simulación de DM del Modelo 10. En A podemos observar los valores de la distancia de la interacción entre $D27^{Nrf2}$ _R11^{IDR-1002} con valores de 4 Å indicando estabilidad en la interacción durante los primeros 600 ns. En B observamos los valores de distancia de la interacción $E35^{Nrf2}$ -R3^{IDR-1002} de 4.5 Å. En C los valores de distancia para $D38^{Nrf2}$ _V1(+NH₃)^{IDR-1002} de ~4 Å. En D y E observamos las distancias para las interacciones $D27^{Nrf2}$ _R9^{IDR-1002} y $D27^{Nrf2}$ _W8^{IDR-1002} rondando valores de 10-12 Å respectivamente del inicio de la simulación hasta un tiempo de 600 ns, posteriormente los valores decrecen hasta estabilizarse cerca de los 4 Å.

10.3.2. ANÁLISIS DE LA ENERGÍA DE INTERACCIÓN

Durante el transcurso de las simulaciones atomísticas de dinámica molecular pudo observarse que la contribución a la energía interacción entre el péptido IDR-1002 y Nrf2 es principalmente de carácter electrostático. Cabe recordar que la mayoría de los residuos de aminoácidos presentes en el motivo de baja afinidad (DLG) de Neh2 presentan carga negativa, al tener residuos como el E y D. El péptido IDR-1002 es catiónico, es decir, tiene residuos con carga positiva como R y K; además, la valina en posición 1 (V1) contribuye también con una carga positiva dado que su grupo amino N-terminal esta protonado (+NH₃), esto hacen posible las interacciones electrostáticas entre ambas moléculas (Figura 20). Esto también pudo comprobarse mediante los análisis de las interacciones electrostáticas y de van der Waals para cada uno de los modelos (Modelo 7 y Modelo 10) generados por dinámica molecular (Figuras 21-22). En el análisis de fluctuaciones de energía de interacción electrostática, de van der Waals y total de no enlace del Modelo 7 (Mutante R9A) durante los últimos 50 ns de la simulación; es evidente que las fluctuaciones energéticas al inicio de la simulación son mayores, mientras que a partir de los 20 ns las fluctuaciones son menores y el valor se torna más negativo aproximadamente de -350 kJ/mol) y se mantiene así hasta el final del tiempo de simulación. Esto indica que el cambio de una R por una A en la posición 9 de IDR-1002 puede inducir un cambio conformacional significativo (Figura 23).

Motivo DLG-Nrf2	Gln-26 (Q)	Asp-27 (D)	Ile-28 (I)	Asp-29 (D)	Leu-30 (L)	Gly-31 (G)							
Carga	Polar sin carga	Carga Negativa	No polar	Carga Negativa	No Polar	No Polar							
IDR-1002	Val-1 (V)	Gln-2 (Q)	Arg-3 (R)	Trp-4 (W)	Leu-5 (L)	Ile-6 (I)	Val-7 (V)	Trp-8 (W)	Arg-9 (R)	Ile-10 (I)	Arg-11 (R)	Lys-12 (K)	
Carga	Carga positiva (+NH ₃)	Polar sin carga	Carga Positiva	No polar Hidrofóbico	No Polar	No Polar	No Polar	No polar Hidrofóbico	Carga Positiva	No Polar	Carga Positiva	Carga Positiva	

Figura 20. Residuos principales del motivo DLG-Neh2-Nrf2 y del péptido IDR-1002. En el panel superior se observan en azul los principales residuos de aminoácidos del dominio Neh2 (motivo de baja afinidad DLG) que tienen cargas negativas. En el panel inferior se observan aquellos residuos básicos en verde que contribuyen con carga positiva en el péptido IDR-1002. Cabe señalar que en la cadena principal del péptido IDR-1002 la valina en posición 1 (V1) contribuye también con una carga positiva dado que su grupo amino N-terminal (+NH₃) esta protonado.

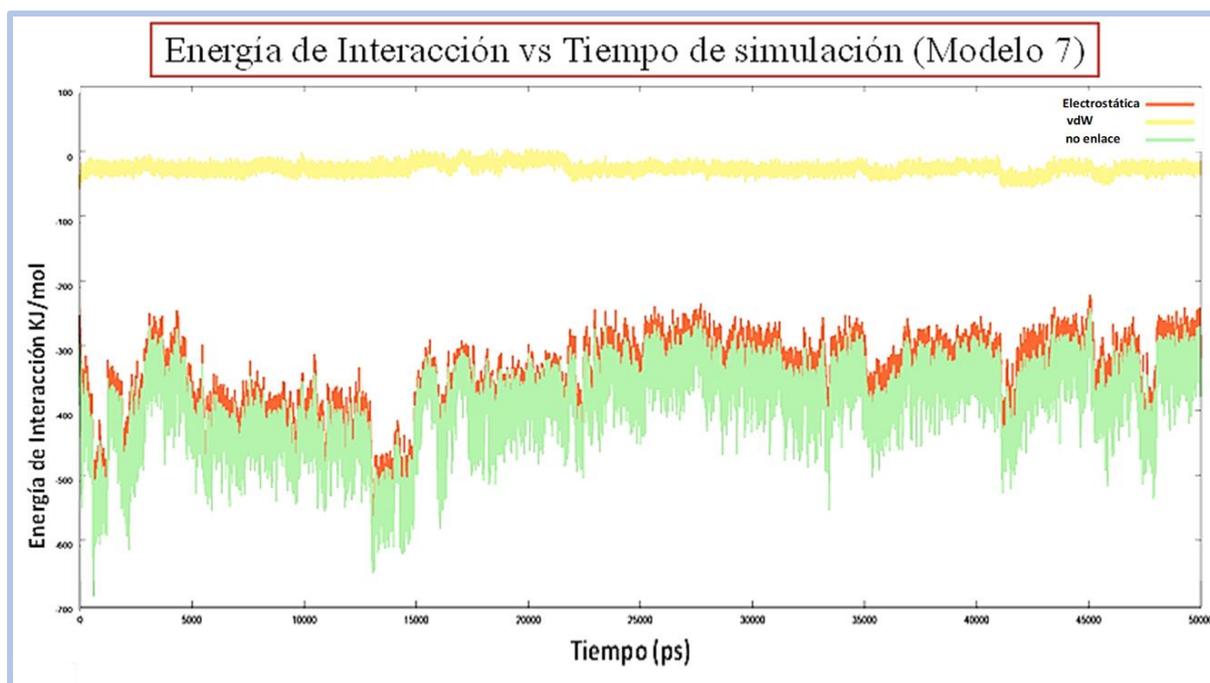


Figura 21. Análisis de fluctuaciones de energía de interacción electrostática, de van der Waals y total de no enlace del modelo 7. La energía de van der Waals es casi despreciable en comparación con la energía electrostática que tiene valores aproximados de -450 a -350 kJ/mol. Por lo tanto, la naturaleza de las interacciones entre el dominio Neh2 de Nrf2 y IDR-1002 son principalmente de naturaleza electrostática.

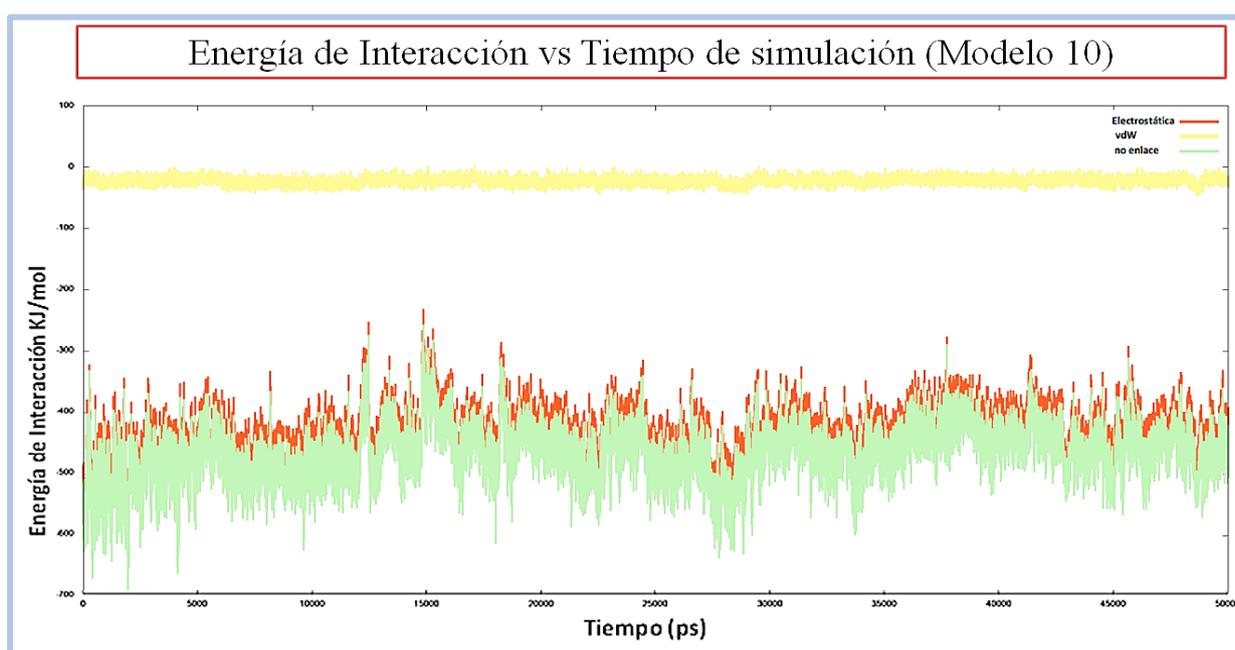


Figura 22. Análisis de fluctuaciones de energía de interacción electrostática, de van der Waals y total de no enlace del modelo 10. Como puede verse, la energía de van der Waals es casi despreciable en comparación con la electrostática. Al igual que en el modelo 7 la naturaleza de las interacciones entre Nrf2 e IDR-1002 es de tipo electrostático, con valores aproximados de -450 kJ/mol durante todo el tiempo de simulación.

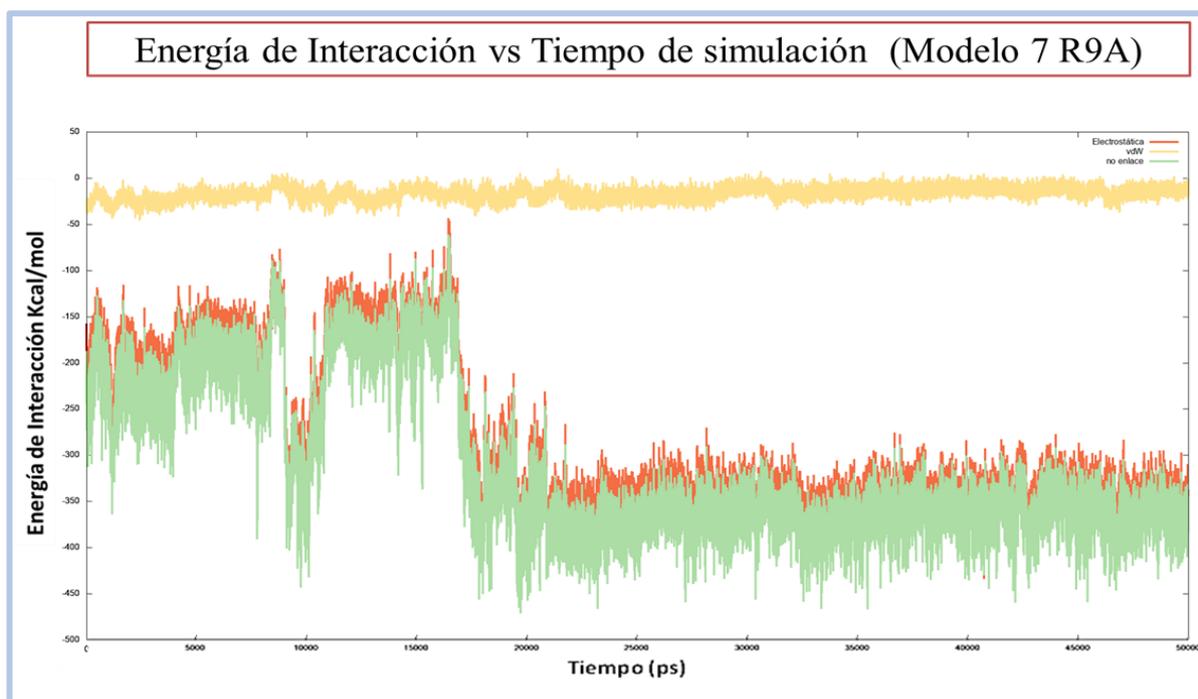


Figura 23. Análisis de fluctuaciones de energía de interacción electrostática, de van der Waals y total de no enlace del Modelo 7 (Mutante R9A) durante los últimos 50 ns de la simulación. Se observa que la naturaleza de las interacciones entre IDR-1002-R9A y Nrf2 son principalmente electrostáticas.

10.4. ESTUDIO BIOQUÍMICO EXPERIMENTAL

10.4.1. DETECCIÓN DE Nrf2 POR WESTERN BLOT

La activación de enzimas antioxidantes de fase 2 ocurre cuando el factor de transcripción Nrf2 se activa por ERO, electrófilos o inhibidores de la interacción entre Nrf2 y Keap1. Posteriormente, es translocado al núcleo celular por proteínas como la exportina 1, y una vez en el núcleo se une al ADN formando un heterodímero con proteínas pequeñas del oncogén homólogo del fibrosarcoma músculo aponeurótico “Maf” (por sus siglas en inglés: *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*) en la región promotora conocida como el elemento de respuesta antioxidante (ARE). Para conocer si los péptidos IDR-1002 e IDR-1002-R9A, inducían la acumulación de Nrf2 en núcleo, las células epiteliales de riñón HEK293 se estimularon con 50 μ M de cada uno de los péptidos y 30 μ M del control positivo TBHQ (tert-Butylhydroquinone) durante 1 hora. Se obtuvo la fracción enriquecida en proteína nuclear y se procedió a realizar los ensayos tipo Western blot después de separar las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los resultados

muestran que el péptido IDR-1002 promovió la mayor acumulación nuclear de Nrf2 en comparación con la mutante R9A (**Figura 24**).

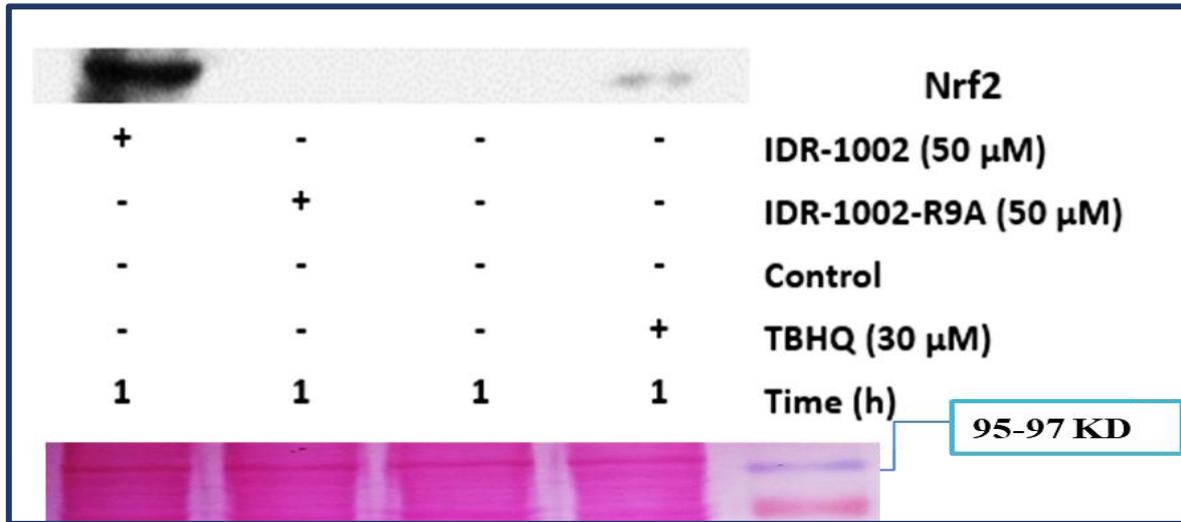


Figura 24. El péptido IDR-1002 promueve la translocación al núcleo de Nrf2 en células HEK293. Las células HEK293 se estimularon durante 1 h con 50 μM de IDR-1002, 50 μM de IDR-1002-R9A y 30 μM de TBHQ. La fracción enriquecida en proteína nuclear de las células HEK293 se analizó por ensayo tipo Western blot. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau como control de carga.

10.4.2. DETECCIÓN DE HEMOXIGENASA 1 (HO-1) POR WESTERN BLOT

La síntesis de enzimas antioxidantes como la hemoxigenasa 1 (HO-1) ocurre cuando Nrf2 es translocado al núcleo y se une al ADN en las secuencias consenso ARE promoviendo la expresión del gen correspondiente. Para conocer si el péptido IDR-1002 y el péptido mutante IDR-1002-R9A inducían la expresión de HO-1 en las células HEK293 se obtuvieron fracciones enriquecidas en proteína citoplásmica y nuclear. Las proteínas de estas fracciones se separaron por electroforesis SDS_PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los ensayos tipo Western blot demostraron que la estimulación durante 4 h de HEK293 con el péptido IDR-1002 produjo una acumulación aparente de HO-1. La acumulación de HO-1 en HEK293 estimuladas con IDR-1002-R9A fue significativamente menor, comparada con la expresión de esta enzima en HEK293 tratadas con IDR-1002 (**Figura 25**). También puede observarse una elevada acumulación de HO-1 por efecto de la incubación de HEK293 con TBHQ, un compuesto ampliamente usado como control positivo en este tipo de ensayos de inducción, ya que se sabe que el estrés oxidante inducido por terc-butilhidroquinona (TBHQ) también puede inducir genes impulsados por el elemento de respuesta antioxidante (ARE) para restaurar la homeostasis redox y reducir lesiones asociadas al estrés oxidante entre ellos a Nrf2 y enzimas como la hemoxigenasa 1 (HO-1) (Li *et al.*, 2005, Nguyen *et al.*, 2003 y Jiang *et al.*, 2016). Estos resultados indican que IDR-1002 al igual que TBHQ es un potente inductor de la expresión de HO-1 y que el

cambio de R por A en la posición 9 afecta la potencia del péptido. Además, sugiere que, debido al cambio de R por A, la interacción iónica entre R9 del IDR-1002 y D27 de Nrf2 se pierde, tal y como predice el modelo 10 derivado de la DM.

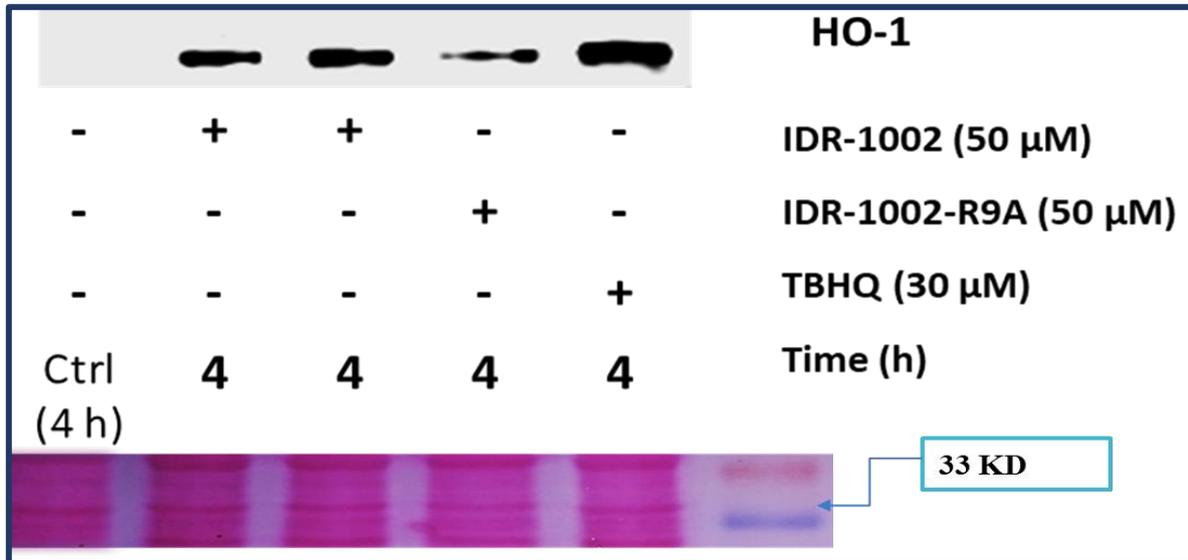


Figura 25. El péptido IDR-1002 promueve la expresión nuclear de HO-1 en células HEK293. Las células HEK293 se estimularon durante 4 h con 50 μM de IDR-1002, 50 μM de IDR-1002-R9A y 30 μM de terbutilhidroquinona (TBHQ). La fracción enriquecida en proteína nuclear de las células HEK293 se analizó por ensayo tipo Western blot. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau como control de carga

10.4.3. CUANTIFICACIÓN DE Nrf2 POR ENSAYO DE ELISA

La activación del factor de transcripción Nrf2 ocurre cuando ciertos compuestos inhibidores de la interacción entre Nrf2 y Keap1 inducen su acumulación citoplásmica de Nrf2 y su posterior translocación al núcleo celular, se sabe que en la inflamación renal aguda ocasionada por reperfusión isquémica las células endoteliales del riñón promueven la inflamación al aumentar la expresión de moléculas de adhesión y la permeabilidad vascular promoviendo la extravasación de leucocitos al riñón, mientras que las células epiteliales de riñón conducen a la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias a la zona de lesión desencadenando el proceso inflamatorio, resultando en la pérdida de la homeostasis del sistema inmunológico y de la función renal así como en una extensión de la lesión celular (Sutton *et al.*, 2003, Kinsey *et al.*, 2008). En este contexto el endotelio juega un papel temprano e importante en la respuesta inflamatoria al daño renal (Kinsey *et al.*, 2008, Thurman *et al.*, 2006), por lo que tomando esto en consideración se decidió utilizar células endoteliales de bovino (CEB) para conocer si los péptidos IDR-1002 e IDR-1002-R9A, inducían la translocación y acumulación de Nrf2 en núcleo celular, por ende las células endoteliales de bovino (CEB) se estimularon con 50 μM de cada uno de los péptidos y 30 μM de TBHQ (control positivo) durante 45 min. Después de esta incubación,

se preparó la fracción enriquecida en proteína nuclear y se evaluaron las concentraciones de Nrf2 en núcleo mediante ensayo tipo ELISA (Figura 26). Encontramos que las concentraciones de Nrf2 nuclear fueron significativamente mayores en células estimuladas con IDR-1002 nativo, en comparación con células no tratadas o tratadas con IDR-1002-R9A. Los cálculos estadísticos demostraron que hubo diferencia significativa entre TBHQ y células no tratadas o tratadas con IDR-1002-R9A, pero no entre IDR-1002 y el control positivo TBHQ. Aunado a los experimentos aquí presentados se tiene pendiente medir por ensayos de ELISA la acumulación de HO-1 en extractos totales de proteína en células endoteliales de bovino.

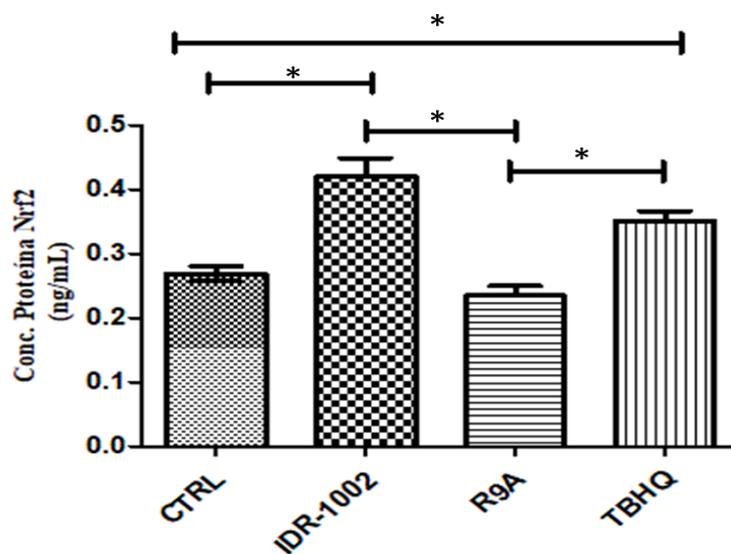


Figura 26. IDR-1002 induce la translocación al núcleo de Nrf2 en células endoteliales de bovino (CEB). La concentración de Nrf2 nuclear fue comparativamente mayor en células estimuladas con IDR-1002, en comparación con células no tratadas sin estímulo (CTRL) al igual que con células tratadas con la mutante R9A. Los resultados son indicativos de tres experimentos independientes, las barras indican la media \pm DE, las barras horizontales indican diferencia estadística $P < 0.05$, $n = 3$ por el método de ANOVA de un factor.

10.5. DISCUSIÓN

Nrf2 es un factor de transcripción crucial en la regulación de la respuesta a diversos tipos de estrés celular mediante la activación de diversos mecanismos citoprotectores, como la inducción y síntesis de enzimas detoxificantes, antioxidantes y proteínas que promueven la citoprotección ERO y de estrés electrofílico (Kansanen *et al.*, 2013). Dentro de la gran gama de proteínas y enzimas activadas por Nrf2 destacan proteínas relacionadas con la síntesis de glutatión como la γ -glutamato-cisteína ligasa, proteínas como thioredoxin-1, thioredoxin reductase-1 y sulfiredoxin-1, involucradas en la homeostasis de grupos tioles y de proteínas, así como de enzimas involucradas en los mecanismos de

detoxificación de Fase I y Fase II como la NAD(P)H: quinona oxidoreductasa-1, glutatión S-transferasa, hemoxigenasa 1 (HO-1), hemoxigenasa 2 (HO-2), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (Zoja *et al.*, 2014; Decoursey & Ligeti, 2005; Bélanger *et al.*, 2003).

Debido a su importancia en el control del estrés oxidante y la inflamación, Nrf2 ha sido objeto de innumerables estudios enfocados al desarrollo y la aplicación de moléculas con actividad inhibitoria de la interacción entre Keap1 y Nrf2. Estos inhibidores podrían usarse como coadyuvantes para el tratamiento o prevención de varios padecimientos que cursan con inflamación, como la enfermedad renal crónica, el cáncer, la diabetes, la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, entre otras.

Por ello, se ha tratado de encontrar y diseñar, mediante técnicas bioquímicas y computacionales, moléculas que puedan servir como activadores de Nrf2 con alta especificidad. En este contexto, se está investigando activamente el diseño de péptidos y moléculas orgánicas sintéticas de bajo peso molecular con capacidad para intercalarse en la zona de interacción entre Keap1 y Nrf2 (Bertrand *et al.*, 2015; Kerr *et al.*, 2017; Mou *et al.*, 2020). La inhibición específica de la interacción entre Keap1 y Nrf2 daría lugar a la translocación al núcleo de Nrf2 y la activación de la respuesta antioxidante y antiinflamatoria.

Se sabe que los primeros inhibidores proteína-proteína (PPI) de Keap1-Nrf2 fueron diseñados tomando como base una serie de péptidos derivados de Nrf2, tanto de su motivo de alta afinidad ETGE como del motivo de baja afinidad DLG, presentes en su dominio Nh2. Este dominio, a su vez, se une a la región C-terminal que contiene al dominio DGR o de repetición de doble Gly, o también llamado Kelch (Hancock *et al.*, 2012). Uno de los primeros péptidos derivados del motivo de alta afinidad de Nrf2 fue **Ac-DEETGEF-OH** que, mediante polarización fluorescente, sirvió para realizar ensayos de evaluación biológica en la inhibición PPI de Nrf2-Keap1 (Hancock *et al.*, 2012). Estos experimentos establecieron que la secuencia de aminoácidos mínima requerida para la unión del motivo de alta afinidad ETGE de Nrf2 con el dominio Kelch de Keap1 era de alrededor de siete residuos de aminoácidos (**Ac-DPETGEL-OH**) cuya secuencia sirvió también como plantilla para generar péptidos nuevos tales como Ac-D (Thp) ETGE (Cha)-OH, H-DEETGEFL-OH, H-EETGEFL-OH, Ac-DPETGEL-OH y H-QLQLDEETGEFL-OH. La principal característica funcional de todos estos péptidos es que compiten con la secuencia principal del motivo ETGE por la unión a Keap1, desestabilizando el complejo estructural Nrf2-Keap1 y promoviendo la activación de Nrf2 (Hancock *et al.*, 2013). Años después, se propusieron varios péptidos derivados del motivo de baja afinidad, surgidos a partir de la secuencia de residuos DLG de Nrf2 (**Ac-WRGDIDL-OH**) de unión con el dominio Kelch de Keap1 (Hancock *et al.*, 2012) que, aunque se sabe que el motivo DLG no contribuye fuertemente en la interacción de Nrf2 con Keap1, la inhibición de la interacción es suficiente para comprometer la interacción fuerte del motivo ETGE con Keap1, promoviendo la activación y posterior translocación de Nrf2 al núcleo celular.

Hoy en día, los cálculos de energía de enlace por acoplamiento molecular combinados con simulaciones de dinámica molecular han proporcionado una perspectiva tanto estructural como energética de los

péptidos inhibidores de la interacción proteína-proteína (PPI) (Mirloy *et al.*, 2014). Sin embargo, el desarrollo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular moduladores de PPI parece bastante lejano. Aun así, estas moléculas moduladoras pueden proporcionar información útil para estudiar la función de las interacciones PP que son la forma de comunicación dentro de la función celular, lo cual puede aprovecharse para la investigación e intervención terapéutica temprana de enfermedades degenerativas (Milroy *et al.*, 2014). Una de las características distintivas de la PPI es que la energía libre se centra en unos pocos residuos de aminoácidos clave o residuos hot-spots, que no sólo proporcionan información acerca de la interfase de unión, sino también de la función de la región de interacción. Aunado a ello la investigación de péptidos puede profundizar la comprensión de los principales factores que contribuyen a la afinidad y especificidad en estas interfases y brindar información de los hot-spots que se están analizando, facilitando el diseño de nuevas moléculas pequeñas PPI (Zerbe *et al.*, 2012).

En este contexto, este trabajo se enfocó a investigar si el péptido regulador de la defensa innata IDR-1002 promovía la actividad de Nrf2, al mantener interacciones moleculares estables proteína-péptido analizadas mediante técnicas bioquímicas y por simulaciones atomísticas de dinámica molecular. La razón de probar este péptido surge de la observación de que IDR-1002 actúa indirectamente eliminando al microorganismo de una infección, modulando la respuesta inmune y ocasionando que citocinas quimio-atrayentes se muevan al punto de infección para destruir al patógeno, evitando con ello una respuesta inflamatoria elevada (Wieczorek *et al.*, 2010). Dado que la inflamación es una consecuencia del estrés oxidante y el péptido IDR-1002 es capaz de modular la actividad de Nrf2 (Maldonado-Baizabal, 2018, datos no publicados) y al ser un factor transcripcional que reduce las ERO, como consecuencia logra modular negativamente la inflamación. Esta hipótesis también se basó en que el péptido IDR-1002 inhibe al factor de transcripción pro-inflamatorio NF- κ B en macrófagos, provocando la disminución de la actividad de NF- κ B (Huante *et al.*, 2016), además de promover la translocación nuclear de Nrf2 en células epiteliales de riñón HEK293 (Maldonado-Baizabal, 2018, datos no publicados) y dado que existe una estrecha interrelación entre ambos, se sabe que la inhibición de uno promueve la actividad del otro (Wardyn *et al.*, 2015).

Por otro lado, estudios previos computacionales de acoplamiento molecular en nuestro laboratorio mostraron la manera en que IDR-1002 interacciona con Nrf2, particularmente con el motivo de baja afinidad (DLG), que es un motivo aniónico del que se ha sugerido que su desunión de Keap1 es suficiente para comprometer la ubiquitinación de Nrf2, lo que promueve su acumulación en el citoplasma y su translocación al núcleo. El acoplamiento molecular “proteína-péptido” entre Nrf2 y el péptido nativo IDR-1002 se llevó a cabo usando el programa *PIPER-FlexPepDock* de *Rosetta Suite*, en el modo de flexibilidad de la proteína durante el acoplamiento del péptido IDR-1002. Se utilizó la estructura del dominio Neh2 de Nrf2 que contiene el motivo DLG (PDB 3WN7), para acoplar la secuencia del péptido IDR-1002 VQRWLIVWRIRK-NH₂. El análisis de acoplamiento entre estas dos moléculas nos proporcionó varias plantillas, de las cuales se seleccionaron solo dos y se nombraron

modelo 7 y modelo 10. Estos estudios sugieren la relevancia de los residuos R3, R9 y R11 como los principales determinantes en la formación de este complejo (ver Figuras 7 y 8). Dado que, en los estudios de acoplamiento molecular, la proteína es rígida y el ligando es flexible, la predicción de la unión no es precisa; por lo tanto, es esencial la flexibilidad del receptor y del ligando, lo cual se logra mediante simulaciones atómicas de dinámica molecular.

Con la idea de validar los modelos 7 y 10 generados por acoplamiento molecular y ver si las interacciones establecidas entre el péptido IDR-1002 y el factor de transcripción Nrf2 no se perdían a lo largo del tiempo, se decidió hacer simulaciones de dinámica molecular tomando como plantilla cada uno de estos modelos durante un periodo de 1000 ns. Dichas simulaciones fueron basadas en conceptos de fisicoquímica y termodinámica estadística para predecir las interacciones posibles entre los átomos.

Los datos sugieren que, aunque los complejos del modelo 10 y 7 son estructuralmente diferentes, la interacción $R9^{IDR-1002}$ y $D27^{Nrf2}$ se mantiene en ambos (ver Figuras 9 y 10). Esto es importante porque demuestra que estas interacciones que formaban parte de los modelos 7 y 10 generados por acoplamiento molecular se mantienen, incluso en los modelos de dinámica molecular. Por otro lado, las interacciones que involucran a los residuos N-terminales $E35^{Nrf2}$ y $R3^{IDR-1002}$, $D38^{Nrf2}$ y $V1 (+NH_3)^{IDR-1002}$ sólo mostraron ser importantes en el Modelo 10 de DM (ver Figura 10); a su vez, las interacciones que involucran residuos básicos como R11 solo fueron importantes en el Modelo 7, representadas por $D27^{Nrf2}$ y $R11^{IDR-1002}$ (ver Figura 9). De los datos también podemos establecer que no se observó participación de $K12^{IDR-1002}$ en ninguna de las simulaciones. Esto es congruente con los datos analizados de la desviación cuadrática media o RMSD, donde para el modelo 7 los valores promedios son 4.5 Å que, al igual que en la estructura nativa de IDR-1002, muestra gran estabilidad durante gran parte del tiempo de la simulación (ver Figura 16), este hecho también se comprueba con los valores de distancia para las interacciones dadas por $D27^{Nrf2}-R9^{IDR-1002}$ y $D27^{Nrf2}-W8^{IDR-1002}$ cuyos valores rondan los 4 Å, lo que demuestra gran estabilidad durante gran parte del tiempo de simulación de DM de estas interacciones (ver Figura 17). Analizando al modelo 10 observamos que sus valores de RMSD de 4.5 Å muestran gran estabilidad durante una buena parte del tiempo de la simulación (ver Figura 18) y que para aquellas interacciones dadas entre $D27^{Nrf2}-R9^{IDR-1002}$, $D27^{Nrf2}-W8^{IDR-1002}$, $E35^{Nrf2}-R3^{IDR-1002}$ y $D27^{Nrf2}-R11^{IDR-1002}$ su estabilidad es denotada con valores de distancia similares o por debajo de 4.5 Å (ver Figura 19). Al comparar los valores de RMSD del modelo 7 y del modelo 10 nos damos cuenta de que ambos comparten una RMSD promedio de 4.5 Å y un conjunto particular de interacciones muy importantes con valores de distancia bajos que rondan los 4 Å ($E35^{Nrf2}-R3^{IDR-1002}$, $D27^{Nrf2}-R9^{IDR-1002}$ y $D27^{Nrf2}-R11^{IDR-1002}$). Dado que los valores de distancia entre residuos también reflejan estabilidad estructural, pequeñas variaciones en los valores medios de las distancias de interacción llevan a la conclusión de que una mutación en estos residuos, que son los más relevantes, podrían afectar el comportamiento dinámico del péptido nativo IDR-1002, proporcionando una base adecuada para futuros análisis en la interacción con Nrf2. Otro aspecto interesante es que la mayoría de las

interacciones tanto para el modelo 7 como para el modelo 10 son de naturaleza electrostática lo que implica que cualquier modificación en la secuencia del péptido IDR-1002 podría alterar las conformaciones preestablecidas por cargas iónicas con Nrf2.

Estos resultados permitieron comprender la dinámica del péptido IDR-1002 detrás de la inhibición Keap1-Nrf2, permitiendo contrastar aún más la importancia de los residuos de aminoácidos que participan en la interacción proteína-péptido al permitirnos simular la interacción entre mutantes puntuales de IDR-1002 (IDR-1002-R3A, IDR-1002-R9A e IDR-1002-R11A) del Modelo 7 y Modelo 10 con Nrf2. Los datos presentados han sugerido que una mutación puntual en R9 por A (R9A) genera un cambio conformacional fuerte en IDR-1002. La mutante R11A podría proporcionar evidencia de la validez del modelo7 sobre el modelo10, ya que la interacción sólo está presente en el primero. Al igual que en R11 la mutante puntual R3A proporcionaría evidencia de la validez del modelo 10 sobre el modelo 7. Es importante mencionar que los resultados obtenidos de los modelos 7 y 10 por dinámica molecular durante 1000 ns nos proporcionó los parámetros necesarios para determinar las interacciones fuertes y estables llevadas a cabo por cada una de las mutantes puntuales del péptido IDR-1002 en relación con Nrf2.

En este trabajo se obtuvo evidencia teórica de que la mutación R9A causó un reordenamiento de la conformación en el modelo 7 y la formación de interacciones estables entre D29 de Nrf2 y R3 o R11 de IDR-1002-R9A (ver [Figura 12](#)). De acuerdo con el modelo 10, la mutación R9A causó un cambio más relevante en la unión del péptido con Nrf2, perdiéndose la interacción establecida previamente con D27 de Nrf2 y R9 de IDR-1002 observadas en el análisis por acoplamiento molecular (ver [Figura 13](#)). De los resultados de dinámica molecular entre IDR-1002-R11A con Nrf2 podemos establecer que la mutación R11A causó un reordenamiento de la conformación en el modelo 7 y la formación de interacciones estables entre D27 de Nrf2 y R11 de IDR-1002-R11A, D29 de Nrf2 y R9 de IDR-1002-R11A que asemejan a las observadas en el modelo 10 del péptido nativo (ver [Figuras 14 y 15](#)). Cuando se introduce la mutación R3A (modelo 10), no solo se debilitan las interacciones en la región N-terminal del péptido, sino que se incrementa el carácter helicoidal alrededor del sitio de la mutación. No obstante, se determinó que no hay péptidos mutantes que se separen por completo del motivo de Nrf2.

Ahora bien, se sabe que una de las formas de activación de Nrf2 se da cuando se promueve la inhibición proteína-proteína entre Keap1 y Nrf2, y una vez libre Nrf2 se acumula en citoplasma y posteriormente es translocado al núcleo celular, donde forma un complejo con otras proteínas nucleares, promoviendo la transactivación de genes citoprotectores con al menos un ARE (*Antioxidant Response Element* o Elemento de Respuesta Antioxidante) para inducir la síntesis de enzimas antioxidantes y detoxificantes de la fase II. Resultados experimentales obtenidos en este trabajo indican que el péptido IDR-1002 induce la translocación de Nrf2 al núcleo en células epiteliales de riñón HEK293 y células endoteliales de bovino (CEB), y también la expresión de hemoxygenasa 1 (HO-1), al ser estimuladas con

concentraciones de 50 μM del péptido. También observamos que en HEK-293 y CEB tratadas con 50 μM de una de las mutantes de IDR-1002 (mutante IDR-1002-R9A) el péptido induce una actividad menor sobre la translocación al núcleo de Nrf2 y una menor expresión de HO-1, en comparación con el péptido nativo. Estos datos validan los resultados obtenidos por dinámica molecular para el modelo 10 donde se determinó que la mutación R9A causó un cambio conformacional más significativo en la unión del péptido con Nrf2, perdiéndose la interacción establecida previamente con D27 de Nrf2 y R9 de IDR-1002 observadas en el análisis por acoplamiento molecular.

El péptido IDR-1002 puede proponerse como una molécula capaz de activar una respuesta antioxidante mediada por Nrf2. La secuencia de aminoácidos de este péptido es susceptible de ser modificada químicamente en las regiones menos relevantes que no incluyan a las argininas en R3, R9 o R11. Esto permitiría sentar las bases para posteriores estudios enfocados en el desarrollo de una segunda generación de péptidos con diversas propiedades nuevas, e.g., mayor afinidad, menor costo, mayor resistencia a la degradación, mayor potencia y tiempo de vida media (farmacóforo), lo cual, a largo plazo, podría convertirse en un biofármaco coadyuvante en el control de las especies reactivas de oxígeno y, como consecuencia, de la inflamación.

10.6. CONCLUSIONES

- El péptido IDR-1002 induce la translocación al núcleo de Nrf2 en células epiteliales de riñón HEK293 y en células endoteliales de bovino.
- El péptido IDR-1002 induce la expresión de hemoxigenasa 1 (HO-1) en células epiteliales de riñón HEK293.
- La abundancia relativa de Nrf2 nuclear fue comparativamente mayor en células estimuladas con IDR-1002, en comparación con células tratadas con la mutante R9A o sin estímulo.
- La mutante IDR-1002-R9A induce una menor translocación de Nrf2 al núcleo y una menor expresión de HO-1 en células HEK293 o CEB estimuladas con 50 μM del péptido.
- En la simulación atómica por dinámica molecular la mutante IDR-1002-R9A causó un cambio conformacional más significativo en la unión del péptido con Nrf2, perdiéndose la interacción establecida previamente con D27 de Nrf2 y R9 de IDR-1002, observadas en el análisis por acoplamiento molecular.
- En la interacción con Nrf2, la mutante IDR-1002-R11A causó un reordenamiento de la conformación y la formación de interacciones estables entre D27 de Nrf2 y R11 de IDR-1002-R11A, D29 de Nrf2 y R9 de IDR-1002-R11A que son similares a las observadas con el péptido nativo.

- Cuando se introduce la mutación IDR-1002-R3A, se debilitan las interacciones en la región N-terminal del péptido.
- Las interacciones entre el péptido IDR-1002 y Nrf2 son principalmente electrostáticas.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Huante M, A., Silva G, O., Oviedo B, J., Hancock., Baizabal A, VM. (2016). Peptide IDR-1002 Inhibits NF- κ B Nuclear Translocation by Inhibition of I κ B α Degradation and Activates p38/ERK1/2–MSK1-Dependent CREB Phosphorylation in Macrophages Stimulated with Lipopolysaccharide. *Front Immun*, 7(533) 1-7.
2. Maldonado P, M.C., Análisis de la actividad del factor de transcripción Nrf2 en células HEK293 estimuladas con péptidos IDR. Morelia. (2018). Tesis presentada en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo para optar por el título de Maestra en Ciencias Biológicas; pp 69. Michoacán, México.
3. Itoh K., Tong KI, Yamamoto M. (2004). Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36:1208-1213.
4. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., & Nabeshima, Y. I. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications*, 236(2), 313-322.
5. Blouin CC, Page EL, Soucy GM, Richard DE. (2004). Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood* 103:1124-1130.
6. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. (2016). NF-kappaB and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J* 283:413-424
7. Königsberg, F.M. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB* 26 :18-25
8. Lee JM, Johnson JA. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 37:139-143
9. Kobayashi A, Yamamoto M. (2006). Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advan Enzyme Reg* 46: 113-140
10. Wardyn, D., Ponsford, M. & Sanderson, C. (2015). Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans*, 43: 621–626
11. Chen W, Sun Z, Wang XJ, Jiang T, Huang Z, Fang D, and Zhang DD. (2009). Direct interaction between Nrf2 and p21 (Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell* 34:663–673

12. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, et al. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 12:213–223
13. Wang, H., Liu, K., Geng, M., Gao, P., Wu, X., Hai, Y. (2013). RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res*, 73:3097–3108
14. Kensler TW, Wakabayashi N, Visual S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:6.1-6.28.
15. Hayes, D.J., McMahon, M. (2009). NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptative response in cancer. *Trends Biochem Sci.* 34:176-188.
16. Kobayashi A, Kang M, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M (2006) Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of keap. *Mol Cel Biol* 26:221-229.
17. Ersson, C.; Thorman, R.; Rodhe, Y.; Moller, L.; Hylander, B. (2011). DNA damage in salivary gland tissue in patients with chronic kidney disease, measured by the comet assay. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112: 209–215.
18. Onyango A. N. (2016). Endogenous Generation of Singlet Oxygen and Ozone in Human and Animal Tissues: Mechanisms, Biological Significance, and Influence of Dietary Components. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 2398573.
19. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., y Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry.* 30:11–26.
20. Fuse, Y., y Kobayashi, M. (2017). Conservation of the Keap1-Nrf2 System: An Evolutionary Journey through Stressful Space and Time. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 22(3):436.
21. Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A. y Yamamoto, M. (2001), Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes to Cells.* 6: 857-868.
22. Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A., & Hayes, J. D. (2013). Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene.* 32:3765–3781.
23. Bugno, Magdalena, M., Daniel, N.L., Chepelev y Willmore W.G. (2015). Changing gears in Nrf1 research, from mechanisms of regulation to its role in disease and prevention. *Biochim. Biophys. Acta*, 1849 (10):1260-1276.
24. Tebay, L. E., Robertson, H., Durant, S. T., Vitale, S. R., Penning, T. M., Dinkova-Kostova, A. T., & Hayes, J. D. (2015). Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free radical biology & medicine*, 88:108–146.
25. McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., y Hayes, J. D. (2006). Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a “Tethering”

- mechanism a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 24756-24768.
26. Rada, P., Rojo, A. I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J. D., & Cuadrado, A. (2011). SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Molecular and cellular biology*, 31:6, 1121–1133.
 27. Zhang, Q., Pi, J., Woods, C. G., & Andersen, M. E. (2010). A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response. *Toxicology and applied pharmacology*, 244:1, 84-97.
 28. Lu, X. Y., Wang, H. D., Xu, J. G., Ding, K., y Li, T. (2015). Deletion of Nrf2 exacerbates oxidative stress after traumatic brain injury in mice. *Cellular and molecular neurobiology*, 35:5, 713-721.
 29. Pi, J., Bai, Y., Reece, J. M., Williams, J., Liu, D., Freeman, M. L., Fahl, W. E., Shugar, D., Liu, J., Qu, W., Collins, S., & Waalkes, M. P. (2007). Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free radical biology & medicine*, 42:12, 1797–1806.
 30. Apopa, P. L., He, X., & Ma, Q. (2008). Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 22:1, 63–76.
 31. Huang, H. C., Nguyen, T., & Pickett, C. B. (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97:23, 12475–12480.
 32. Bloom, D. A., & Jaiswal, A. K. (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 gene expression. *The Journal of biological chemistry*, 278:45, 44675–44682.
 33. Li, R., Jia, Z., & Zhu, H. (2019). Regulation of Nrf2 Signaling. *Reactive oxygen species (Apex, N.C.)*, 8:24, 312–322.
 34. Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A., & Hayes, J. D. (2013). Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene*, 32:32, 3765–3781.
 35. Hancock, R., Bertrand, H. C., Tsujita, T., Naz, S., El-Bakry, A., Laoruchupong, J., Hayes, J. D., & Wells, G. (2012). Peptide inhibitors of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction. *Free radical biology & medicine*, 52:2, 444–451.
 36. Graham F., Simley J., Russell W. and Nairn R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*, 36:1, 59-72.
 37. Thomas P. and Smart T. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51:3, 187-200.

38. Mou, Y., Wen S., Li Y.X., Gao X.X., Zhang, X and Jiang Z.Y. (2020). Recent progress in Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 202, 112532.
39. Jiang, X., An, Z., Lu, C., Chen, Y., Du, E., Qi, S., & Xu, Y. (2016). The protective role of Nrf2-Gadd45b against antimony-induced oxidative stress and apoptosis in HEK293 cells. *Toxicology Letters*, 256, 11-18.
40. Nguyen, T., Sherratt, P. J., & Pickett, C. B. (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43:1, 233-260.
41. Thomas P, Smart TG. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 3:187-200.
42. Gueret, V., Negrete-Virgen, J. A., Lyddiatt, A., & Al-Rubeai, M. (2002). Rapid titration of adenoviral infectivity by flow cytometry in batch culture of infected HEK293 cells. *Cytotechnology*, 38:1, 87-97.
43. Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical reviews in biotechnology*, 36:6, 1110–1122.
44. Raghubeer, S., Nagiah, S., & Chaturgoon, A. A. (2017). Acute Ochratoxin A exposure induces inflammation and apoptosis in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Toxicol*, 137, 48-53.
45. Panieri, E., & Saso, L. (2019). Potential Applications of NRF2 Inhibitors in Cancer Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019:8592348.
46. Kinsey, G. R., Li, L., & Okusa, M. D. (2008). Inflammation in acute kidney injury. *Nephron. Experimental nephrology*, 109:4, e102–e107.
47. Thurman, J. M., Ljubanović, D., Royer, P. A., Kraus, D. M., Molina, H., Barry, N. P., Proctor, G., Levi, M., & Holers, V. M. (2006). Altered renal tubular expression of the complement inhibitor Crry permits complement activation after ischemia/reperfusion. *The Journal of clinical investigation*, 116:2, 357–368.
48. Sutton, T. A., Mang, H. E., Campos, S. B., Sandoval, R. M., Yoder, M. C., & Molitoris, B. A. (2003). Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *American journal of physiology. Renal physiology*, 285:2, F191–F198.
49. Bertrand, H. C., Schaap, M., Baird, L., Georgakopoulos, N. D., Fowkes, A., Thiollier, C., Kachi, H., Dinkova-Kostova, A. T., & Wells, G. (2015). Design, Synthesis, and Evaluation of Triazole Derivatives That Induce Nrf2 Dependent Gene Products and Inhibit the Keap1-Nrf2 Protein-Protein Interaction. *Journal of medicinal chemistry*, 58:18, 7186–7194.
50. Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H., & Levonen, A. L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox biology*, 1:1, 45–49.
51. Zoja, C., Benigni, A., & Remuzzi, G. (2014). The Nrf2 pathway in the progression of renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29:1, i19-i24.

52. Hancock, R., Schaap, M., Pfister, H., & Wells, G. (2013). Peptide inhibitors of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction with improved binding and cellular activity. *Organic & biomolecular chemistry*, *11*:21, 3553–3557.
53. Zerbe, B. S., Hall, D. R., Vajda, S., Whitty, A., & Kozakov, D. (2012). Relationship between hot spot residues and ligand binding hot spots in protein-protein interfaces. *Journal of chemical information and modeling*, *52*:8, 2236–2244.
54. Wieczorek, M., Jenssen, H., Kindrachuk, J., Scott, W. R., Elliott, M., Hilpert, K., Cheng, J. T., Hancock, R. E., & Straus, S. K. (2010). Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity. *Chemistry & biology*, *17*:9, 970–980.
55. Milroy, L. G., Grossmann, T. N., Hennig, S., Brunsveld, L., & Ottmann, C. (2014). Modulators of protein-protein interactions. *Chemical reviews*, *114*:9, 4695–4748.
56. Bell, E. W., Zhang, Y. (2019). DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J Cheminform*, *11*, 40.
57. Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *311*:1152, 617–631.
58. Rushmore, T. H., Morton, M. R., & Pickett, C. B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *The Journal of biological chemistry*, *266*:18, 11632–11639.
59. Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug metabolism reviews*, *43*:2, 138-151.
60. Heitler, W. y London, F. (1927). Wechselwirkung neutraler Atome und homöopolare Bindung nach der Quantenmechanik. *Z Phys*, *44*, 455-472.
61. Karplus, M., and McCammon, J.A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* *9*, 646–652.
62. McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, *267*:5612, 585-590.
63. Brünger, A. T., Kuriyan, J., & Karplus, M. (1987). Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics. *Science*, *235*:4787, 458-460.
64. Brünger, A. T., Brooks, C. L., & Karplus, M. (1985). Active site dynamics of ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *82*:24, 8458-8462.
65. Artymiuk, P. J., Blake, C. C. F., Grace, D. E. P., Oatley, S. J., Phillips, D. C., & Sternberg, M. J. E. (1979). *Crystallographic studies of the dynamic properties of lysozyme*. *Nature*, *280*:5723, 563-568.
66. Frauenfelder, H., Petsko, G. A., & Tsernoglou, D. (1979). Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature*, *280*:5723, 558-563.
67. Ichiye, T., & Karplus, M. (1983). Fluorescence depolarization of tryptophan residues in proteins: a molecular dynamics study. *Biochemistry*, *22*:12, 2884-2893.
68. Case, D. A., & Karplus, M. (1979). Dynamics of ligand binding to heme proteins. *Journal of molecular biology*, *132*:3, 343-368.

69. Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99:6, 1129-1143.
70. Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015). *Understanding the basics of QSAR for applications in pharmaceutical sciences and risk assessment*. Academic press.
71. Perez, S., & Tvaroška, I. (2014). Carbohydrate–protein interactions: Molecular modeling insights. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 71, 9-136.
72. Hancock, R. E., & Chapple, D. S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(6), 1317-1323.
73. Haspel, N., Moll, M., Baker, M. L., Chiu, W., & Kavraki, L. E. (2010). Tracing conformational changes in proteins. *BMC structural biology*, 10(1), 1-11.
74. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*, 3(11), 935-949.
75. Kolb, P., & Irwin, J. J. (2009). Docking screens: right for the right reasons? *Current topics in medicinal chemistry*, 9(9), 755-770.
76. Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2019). Acoplamiento molecular: avances recientes y retos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(S1), 65-87.
77. Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T. & Shenkin, P. S. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry*, 47(7), 1739-1749.
78. Bultinck, P., De Winter, H., Langenaeker, W., & Tollenare, J. P. (Eds.). (2003). *Computational medicinal chemistry for drug discovery*. CRC Press. 769 pp.
79. Aminpour, M., Montemagno, C., & Tuszynski, J. A. (2019). An overview of molecular modeling for drug discovery with specific illustrative examples of applications. *Molecules*, 24:9, 1693.
80. Huang, S. Y. (2018). Comprehensive assessment of flexible-ligand docking algorithms: current effectiveness and challenges. *Briefings in bioinformatics*, 19(5), 982-994.
81. Sies, H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks in: *Oxidative Stress* (Sies, H., Ed.).
82. Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M., & Gelpí, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, 8, 37.
83. Baig, M. H., Sudhakar, D. R., Kalaiarasan, P., Subbarao, N., Wadhawa, G., Lohani, M., & Khan, A. U. (2014). Insight into the effect of inhibitor resistant S130G mutant on physico-chemical properties of SHV type beta-lactamase: A molecular dynamics study. *PLoS One*, 9:12, e112456.
84. Toxvaerd, S. (1993). Molecular dynamics at constant temperature and pressure. *Physical Review E*, 47:1, 343.
85. Liu, J., Li, D., & Liu, X. (2016). A simple and accurate algorithm for path integral molecular dynamics with the Langevin thermostat. *The Journal of chemical physics*, 145:2, 024103.

86. Weinan, E., & Li, D. (2008). The Andersen thermostat in molecular dynamics. *Communications on pure and applied mathematics*, 61:1, 96-136.
87. Braga, C., & Travis, K. P. (2005). A configurational temperature Nosé-Hoover thermostat. *The Journal of chemical physics*, 123:13, 134101.
88. González, M. A. (2011). Force fields and molecular dynamics simulations. *École thématique de la Société Française de la Neutronique*, 12, 169-200.
89. Lindorff-Larsen, K., Maragakis, P., Piana, S., Eastwood, M. P., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2012). Systematic validation of protein force fields against experimental data. *PloS one*, 7(2), e32131.
90. Niklasson, A. M., Tymczak, C. J., & Challacombe, M. (2006). Time-reversible Born-Oppenheimer molecular dynamics. *Physical review letters*, 97(12), 123001.
91. Adcock, S. A., & McCammon, J. A. (2006). Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical reviews*, 106(5), 1589-1615.
92. Zimmerman, P. M., Head-Gordon, M., & Bell, A. T. (2011). Selection and validation of charge and Lennard-Jones parameters for QM/MM simulations of hydrocarbon interactions with zeolites. *Journal of chemical theory and computation*, 7(6), 1695-1703.
93. Davis, M. E., & McCammon, J. A. (1990). Electrostatics in biomolecular structure and dynamics. *Chemical Reviews*, 90(3), 509-521.
94. Mobley, D. L., Bannan, C. C., Rizzi, A., Bayly, C. I., Chodera, J. D., Lim, V. T., ... & Eastman, P. K. (2018). Escaping atom types in force fields using direct chemical perception. *Journal of chemical theory and computation*, 14(11), 6076-6092.
95. Kaminski, G., & Jorgensen, W. L. (1996). Performance of the AMBER94, MMFF94, and OPLS-AA force fields for modeling organic liquids. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(46), 18010-18013.
96. Smith, M. D., Rao, J. S., Segelken, E., & Cruz, L. (2015). Force-field induced bias in the structure of A β 21–30: A comparison of OPLS, AMBER, CHARMM, and GROMOS force fields. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(12), 2587-2595.
97. Schwieters, C. D., Bermejo, G. A., & Clore, G. M. (2018). Xplor-NIH for molecular structure determination from NMR and other data sources. *Protein Science*, 27(1), 26-40.
98. Starovoytov, O. N., Torabifard, H., & Cisneros, G. A. (2014). Development of AMOEBA force field for 1, 3-dimethylimidazolium based ionic liquids. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(25), 7156-7166.
99. Zhu, X., Lopes, P. E., & MacKerell Jr, A. D. (2012). Recent developments and applications of the CHARMM force fields. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2(1), 167-185.
100. Salmaso, V., & Moro, S. (2018). Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. *Frontiers in pharmacology*, 9, 923.
101. Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, 7(2), 146-157.

102. Brás, N. F., Coimbra, J. T. S., Neves, R. P. P., Cerqueira, N. M. F. S. A., Sousa, S. F., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2015). Computational Biochemistry. Molecular Sciences and Chemical Engineering. *Elsevier*.
103. Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature protocols*, *11*:5, 905-919.
104. John, S. T., Ma, Y., & Tutuncu, H. M. (2005). Superconductivity in simple elemental solids—a computational study of boron-doped diamond and high-pressure phases of Li and Si. *Journal of Physics: Condensed Matter*, *17*(11), S911.
105. Kraka, E., & Cremer, D. (2010). Computational analysis of the mechanism of chemical reactions in terms of reaction phases: hidden intermediates and hidden transition states. *Accounts of chemical research*, *43*(5), 591-601.
106. Lan, Y., Tong, M., Yang, Q., & Zhong, C. (2017). Computational screening of covalent organic frameworks for the capture of radioactive iodine and methyl iodide. *CrystEngComm*, *19*(33), 4920-4926.
107. Fernbach, S., & Taub, A. (1970). Computers and Their Role in the Physical Sciences.
108. McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, *267*:5612, 585-590.
109. Crippen, G. M. (1977). A novel approach to calculation of conformation: distance geometry. *Journal of Computational Physics*, *24*:1, 96-107.
110. Langridge, R. (1974). Interactive three-dimensional computer graphics in molecular biology. In *Computers in Life Science Research* (pp. 53-59). Springer, Boston, MA.
111. Allinger, N. L., & Sprague, J. T. (1973). Conformational analysis. XC. Calculation of the structures of hydrocarbons containing delocalized electronic systems by the molecular mechanics method. *Journal of the American Chemical Society*, *95*(12), 3893-3907.
112. Hendrickson, J. B. (1961). Molecular geometry. I. Machine computation of the common rings. *Journal of the American Chemical Society*, *83*:22, 4537-4547.
113. Hansch, C., & Fujita, T. (1964). ρ - σ - π Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, *86*(8), 1616-1626.
114. Pople, J. A., Santry, D. P., & Segal, G. A. (1965). Approximate self-consistent molecular orbital theory. I. Invariant procedures. *The Journal of Chemical Physics*, *43*(10), S129-S135.
115. Levinthal, C. (1966). Molecular model-building by computer. *Scientific american*, *214*(6), 42-53.
116. Levitt, M., & Lifson, S. (1969). Refinement of protein conformations using a macromolecular energy minimization procedure. *Journal of molecular biology*, *46*(2), 269-279.
117. Metropolis, N., & Ulam, S. (1949). The Monte Carlo method. *Journal of the American statistical association*, *44*(247), 335-341.
118. PediaPress. (2011). Computational Science. En: Computer Science: An Overview (12da Edición). PediaPress, Mainz, Alemania.

119. Roothaan, C. C. J. (1951). The linear combination of atomic orbitals -molecular orbital self-consistent field (LCAO-MO-SCF) method. *Rev. Mod. Phys.* 23, 69.
120. Breitenbach, M., & Eckl, P. (2015). Introduction to oxidative stress in biomedical and biological research. 1169-1177 pp.
121. Sajadimajd, S., & Khazaei, M. (2018). Oxidative stress and cancer: the role of Nrf2. *Current cancer drug targets*, 18:6, 538-557.
122. Kufareva, I., & Abagyan, R. (2011). Methods of protein structure comparison. In *Homology Modeling* (pp. 231-257). Humana Press.
123. Li, J., Johnson, D., Calkins, M., Wright, L., Svendsen, C., & Johnson, J. (2005). Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. *Toxicological Sciences*, 83:2, 313-328.
124. Hancock, R. E., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24:12, 1551-1557.
125. Cherkasov, A., Hilpert, K., Jenssen, H., Fjell, C. D., Waldbrook, M., Mullaly, S. C. & Hancock, R. E. (2009). Use of artificial intelligence in the design of small peptide antibiotics effective against a broad spectrum of highly antibiotic-resistant superbugs. *ACS chemical biology*, 4:1, 65-74.
126. Pena, O. M., Afacan, N., Pistolic, J., Chen, C., Madera, L., Falsafi, R. & Hancock, R. E. (2013). Synthetic cationic peptide IDR-1018 modulates human macrophage differentiation. *PloS one*, 8:1, e52449.
127. Achtman, A. H., Pilat, S., Law, C. W., Lynn, D. J., Janot, L., Mayer, M. L. & Schofield, L. (2012). Effective adjunctive therapy by an innate defense regulatory peptide in a preclinical model of severe malaria. *Science Translational Medicine*, 4:135, 135ra64-135ra64.
128. Iyanagi, T. (2007). Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *International review of cytology*, 260, 35-112.
129. Bélanger, A., Pelletier, G., Labrie, F., Barbier, O., & Chouinard, S. (2003). Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14(10), 473-479.
130. Holtzclaw, W. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Advances in enzyme regulation*, 44(1), 335-367.
131. Miller, E. C., Miller, J. A., & Hartmann, H. A. (1961). N-Hydroxy-2-acetylaminofluorene: a metabolite of 2-acetylaminofluorene with increased carcinogenic activity in the rat. *Cancer Research*, 21(6), 815.
132. Decoursey, T. E., & Ligeti, E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(19), 2173-2193.
133. Haney, E. F., Wu, B. C., Lee, K., Hilchie, A. L., & Hancock, R. E. (2017). Aggregation and its influence on the immunomodulatory activity of synthetic innate defense regulator peptides. *Cell chemical biology*, 24(8), 969-980.

134. Chaves, M. M., Silvestrini, A. A., Silva-Teixeira, D. N., & Nogueira-Machado, J. A. (1996). Effect in vitro of gamma interferon and interleukin-10 on generation of oxidizing species by human granulocytes. *Inflammation Research*, 45:7, 313-315.
135. Bravo, M., & López-Ortega, A. (1998). Radicales Libres e inflamación. *Gaceta deficiencias veterinarias*, 4(2).
136. Dahlgren, C., & Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *Journal of immunological methods*, 232:1-2, 3-14.
137. Chen, Q., Powell, D. W., Rane, M. J., Singh, S., Butt, W., Klein, J. B., & McLeish, K. R. (2003). Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *The Journal of Immunology*, 170:10, 5302-5308.
138. Cittadini, A., Galeotti, T., & Terranova, T. (1971). The effect of pyruvate on cyanide-inhibited respiration in intact ascites tumor cells. *Experientia*, 27:6, 633-635.
139. Ramírez-Mares, M. V., & Molina, F. A. S. (2009). La azida induce transición de la permeabilidad de la membrana interna en mitocondrias de hígado de rata. *Ciencia y mar*, 37: 29-36.
140. Apopa, P. L., He, X., & Ma, Q. (2008). Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 22:1, 63-76.
141. Pi, J., Bai, Y., Reece, J. M., Williams, J., Liu, D., Freeman, M. & Waalkes, M. P. (2007). Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radical Biology and Medicine*, 42: 12, 1797-1806.
142. Nezu, M., Souma, T., Yu, L., Suzuki, T., Saigusa, D., Ito, S. & Yamamoto, M. (2017). Transcription factor Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression. *Kidney international*, 91:2, 387-401.
143. Nezu, M., & Suzuki, N. (2020). Roles of Nrf2 in protecting the kidney from oxidative damage. *International journal of molecular sciences*, 21:8, 2951.
144. Bertrand, H. C., Schaap, M., Baird, L., Georgakopoulos, N. D., Fowkes, A., Thiollier, C. & Wells, G. (2015). Design, synthesis, and evaluation of triazole derivatives that induce Nrf2 dependent gene products and inhibit the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction. *Journal of medicinal chemistry*, 58(18), 7186-7194.
145. Kerr, F., Sofola-Adesakin, O., Ivanov, D. K., Gatliff, J., Gomez Perez-Nievas, B., Bertrand, H. C. & Partridge, L. (2017). Direct Keap1-Nrf2 disruption as a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *PLoS genetics*, 13:3, e1006593.
146. Bowdish, D. M., Davidson, D. J., Scott, M. G., & Hancock, R. E. (2005). Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(5), 1727-1732.

147. Scott, M. G., Dullaghan, E., Mookherjee, N., Glavas, N., Waldbrook, M., Thompson, A. & Hancock, R. E. (2007). An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nature biotechnology*, 25(4), 465-472.
148. Turner-Brannen, E., Choi, K. Y., Lippert, D. N., Cortens, J. P., Hancock, R. E., El-Gabalawy, H., & Mookherjee, N. (2011). Modulation of interleukin-1 β -induced inflammatory responses by a synthetic cationic innate defence regulator peptide, IDR-1002, in synovial fibroblasts. *Arthritis research & therapy*, 13(4), 1-14.
149. Nijnik, A., Madera, L., Ma, S., Waldbrook, M., Elliott, M. R., Easton, D. M. & Hancock, R. E. (2010). Synthetic cationic peptide IDR-1002 provides protection against bacterial infections through chemokine induction and enhanced leukocyte recruitment. *The Journal of Immunology*, 184:5, 2539-2550.
150. Rivas-Santiago, C. E., Hernández-Pando, R., & Rivas-Santiago, B. (2013). Immunotherapy for pulmonary TB: antimicrobial peptides and their inducers. *Immunotherapy*, 5:10, 1117-1126.
151. Niyonsaba, F., Madera, L., Afacan, N., Okumura, K., Ogawa, H., & Hancock, R. E. (2013). The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *Journal of leukocyte biology*, 94(1), 159-170.
152. Nova, A., & Maseras, F. (2013). Enantioselective Synthesis. In *Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition): From Elements to Applications* (pp. 807-831).
153. Buchenberg, S., Leitner, D. M., & Stock, G. (2016). Scaling rules for vibrational energy transport in globular proteins. *The journal of physical chemistry letters*, 7:1, 25-30.
154. González, M. A. (2011). Force fields and molecular dynamics simulations. *École thématique de la Société Française de la Neutronique*, 12, 169-200.

Anexos

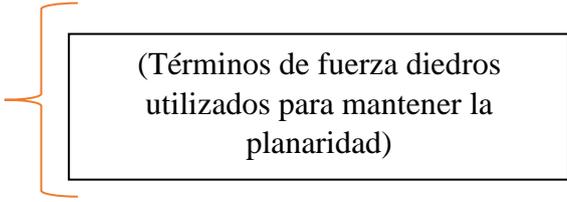
DESCRIPCIÓN DE LOS ARCHIVOS PARA GENERAR UNA SIMULACIÓN DE DINÁMICA MOLECULAR ATOMÍSTICA USANDO NAMD-VMD

Un **archivo pdb** es un archivo que almacena coordenadas atómicas y/o velocidades para un sistema permitiendo describir proteínas y otras macromoléculas biológicas importantes resueltas por cristalografía de rayos X, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) o microscopía crioelectrónica, con lo cual se conoce la ubicación de cada átomo en relación con los demás en la molécula. Estos archivos enumeran los átomos de cada proteína y su ubicación 3D en el espacio para diferentes tipos de residuos y sus coordenadas cartesianas; así mismo, se incluyen las coordenadas de las moléculas de agua, iones y cualquier átomo presente en el sistema. Algunos archivos pdb incluyen múltiples conjuntos de coordenadas para todos los átomos o solo para algunos. Estos archivos están disponibles en varios formatos (PDB, mmCIF, XML). Un archivo con formato pdb clásico incluye un resumen de la proteína e información sobre la resolución de su estructura, seguida de la secuencia y una larga lista de átomos y sus coordenadas.

Un **archivo psf** es un archivo de estructura de proteína, es decir, almacena información estructural de la proteína, contiene toda la información específica necesaria para aplicar un campo de fuerza particular a un sistema molecular. El archivo de parámetros proporciona un mapeo entre las interacciones enlazadas y no enlazadas que involucran las diversas combinaciones de tipos de átomos que se encuentran en el archivo de topología y constantes de resorte específicas y parámetros similares para todos los enlaces, ángulos, ángulos diedros, impropios y términos cruzados.

El archivo psf contiene seis secciones principales de interés:

1. Átomos
2. Enlaces
3. Ángulos
4. Diedros
5. Impropios
6. Términos cruzados.



(Términos de fuerza diedros utilizados para mantener la planaridad)

Los archivos psf pueden estar en formato CHARMM o X-PLOR, donde el formato CHARMM utiliza un número entero en lugar de un nombre para el tipo de átomo. NAMD requiere el formato X-PLOR, que también es más flexible ya que no está vinculado al orden específico de los tipos de átomos en un solo archivo de parámetros. NAMD y VMD requieren que el orden de los átomos en cualquier pdb, dcd u otro archivo de datos atómicos coincida exactamente con el orden que se encuentra en el archivo psf. Varios átomos en un residuo pueden compartir el mismo tipo (por ejemplo, HT1, HT2 son del tipo HC) y que los átomos del mismo elemento pueden tener diferentes tipos (por ejemplo, CA y CB, HA y HT1).

- **La sección de enlace covalente enumera cuatro pares de átomos por línea.**

Ejemplo:

```
1237 !NBOND: bonds
 1      5      2      1      3      1      4      1
 5      6      7      5      7      8      7      9
10     7      10     11     10     12     13     10
```

- **La sección de ángulos enumera tres tripletes de átomos por línea.**

Ejemplo:

```
2257 !NTHETA: angles
 1      5      6      1      5      18     2      1      5
 2      1      4      2      1      3      3      1      5
 3      1      4      4      1      5      5      18     19
```

- **Las secciones de diedros e impropias enumeran dos cuádruples de átomos por línea.**

Ejemplo:

```
3293 !NPHI: dihedrals
 1      5      7      10     1      5      7      8
 1      5      7      9      1      5      18     20
 1      5      18     19     2      1      5      7

204 !NIMPDI: impropers
18      5      20     19     20     18     22     21
30     32     27     31     30     27     32     31
32     30     33     34     32     30     34     33
```

- **Las secciones de términos cruzados enumeran dos cuádruples de átomos por línea.**

Ejemplo:

```
74 !NCRTERM: cross-terms
18     20     22     35     20     22     35     37
35     37     39     54     37     39     54     56
54     56     58     74     56     58     74     76
```

- **Un archivo de parámetros de campo de fuerza.** Un campo de fuerza es una expresión matemática del potencial que experimentan los átomos del sistema. CHARMM, X-PLOR, AMBER y GROMACS son cuatro tipos de campos de fuerza, y NAMD puede usarlos todos.

- El archivo de parámetros define resistencias de unión, longitudes de equilibrio, etc.
- Un archivo de configuración, es aquel en el que el usuario especifica todas las opciones que NAMD debe adoptar al ejecutar una simulación. El archivo de configuración le dice a NAMD cómo se ejecutará la simulación.

Minimización del Sistema

Minimizar: establece el número de interacciones sobre las que variar posiciones del átomo para buscar un mínimo local en el potencial (ejemplo: 100).

Reinicios: La minimización se realiza en el sistema después de que todas las velocidades atómicas se han establecido en cero. Este comando restablece las velocidades atómicas de manera que el sistema comienza a la temperatura especificada (en este caso, \$ temperature o 310K).

Ejecutar o Run: Establece el número de pasos de tiempo sobre los que se ejecutará el equilibrio MD (por ejemplo 2500, que corresponde a 5.000 fs o 5 ps, ya que se ha utilizado un intervalo de tiempo de 2 fs).

Minimización y Equilibrio.

Normalmente, la minimización de MD y las simulaciones de equilibrio involucran más de un ciclo de minimización-equilibrio, a menudo fijando y liberando moléculas en el sistema. Por ejemplo, normalmente se minimiza el sistema y luego se equilibra con los átomos de la proteína fijada en el espacio, y luego se minimiza y se equilibra el sistema nuevamente, esta vez con la proteína libre para moverse. La fijación de la proteína permite que el agua, que típicamente responde mucho más rápido a las fuerzas que la proteína, se relaje en el primer paso. Esto ahorra esfuerzo computacional y evita la introducción de artefactos de una estructura inicial inestable.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	Fecha de inicio	Fecha de terminación
1. Diseñar y probar <i>in silico</i> la interacción de las mutantes del péptido IDR-1002 con Nrf2.	Marzo de 2019	Diciembre de 2019
2. Síntesis de las mutantes del péptido IDR-1002.	Enero de 2020	Febrero de 2020
3. Evaluar experimentalmente el efecto de las mutantes R9A, R11A y R3A del péptido IDR-1002 sobre la translocación al núcleo de Nrf2 en células HEK293. Análisis de resultados.	Marzo de 2020	Septiembre de 2020
4. Escritura de Tesis.	Octubre de 2020	Diciembre 2020
5. Revisión de Tesis.	Enero-Febrero 2021	Enero-Febrero 2021
6. Obtención del grado de Maestría.	Abril de 2021	Abril de 2021