

Ramírez-Salinas GL<sup>1</sup>, Sciutto E<sup>1</sup>, Cruz I<sup>2</sup>, Cervantes-Torres J<sup>1</sup>, Bonifaz L<sup>2</sup>, Fragoso G<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

<sup>2</sup> Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades Dr. Bernardo Sepúlveda, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México.

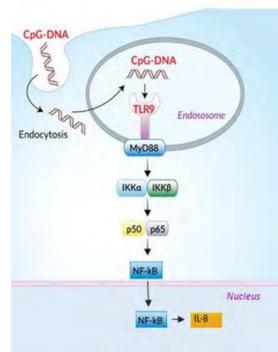
### INTRODUCCIÓN

El péptido inmunomodulador GK-1, ha demostrado promover la activación de macrófagos dependiente de Myd88, mediante la vía de señalización de NF-κB. MyD88 es el adaptador canónico para las vías de señalización inflamatorias de TLR's.

Este estudio tiene como objetivo determinar si GK-1 es capaz de activar a TLR's.

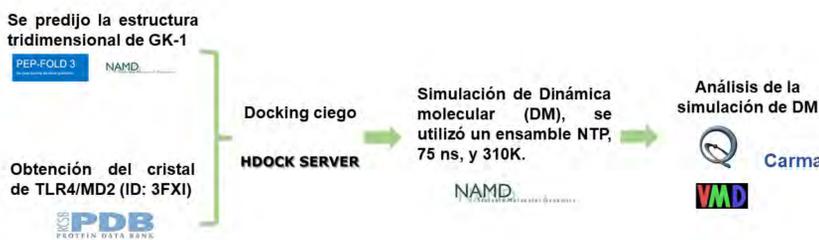
### METODOLOGÍA

**Eta in vitro :** La determinación de la actividad agonista de GK-1 a los receptores TLR's, se evaluó mediante la producción de Interleucina 8 (IL-8), empleando las siguientes líneas celulares: HEK-293-hTLR2, HEK-293-hTLR2/6, HEK-293-hTLR3, HEK-293-hTLR4/MD2, HEK-293-hTLR5 y HEK-293-hTLR7. Línea celular control negativo fue HEK-293-Null.



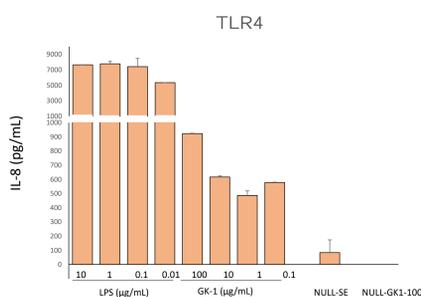
**Figura 1. Sistema de activación de TLR'S :** Las líneas celulares sobre expresan el gen TLR's humano, al ser activado induce el gen promotor NF-κB. El cual induce la producción endógena de IL-8. Modificada de Invivogen.

**Eta in silico :** Se realizó un estudio *in silico* para comprender la afinidad y las interacciones intermoleculares del complejo TLR4/MD2-GK-1.



### RESULTADOS

**Eta in vitro :**

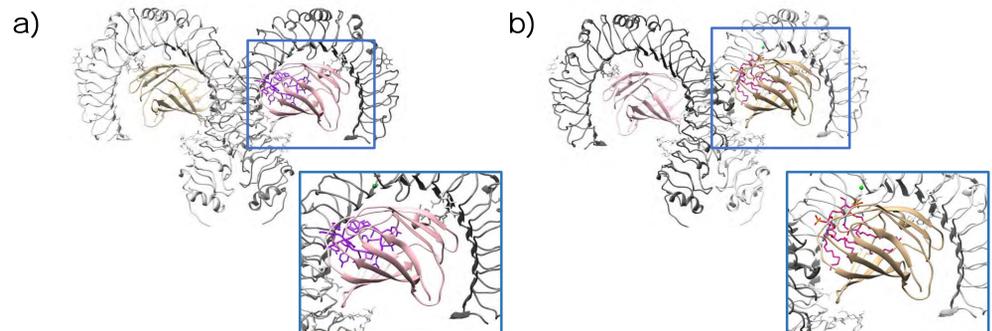


**Figura 2. El péptido GK-1 induce una activación de TLR4:** Se midió la producción de IL-8, para cada una de las líneas celulares estimuladas con GK-1 y sus respectivos agonistas. Para las líneas que sobre expresaban TLR2, TLR3, TLR5, TLR7 y TLR2/6, no hubo producción de IL-8 al ser estimulados con GK-1, pero si con sus respectivos agonista. En cambio para la línea celular HEK-293-hTLR4/MD2, GK-1 es capaz de inducir la producción de IL-8.

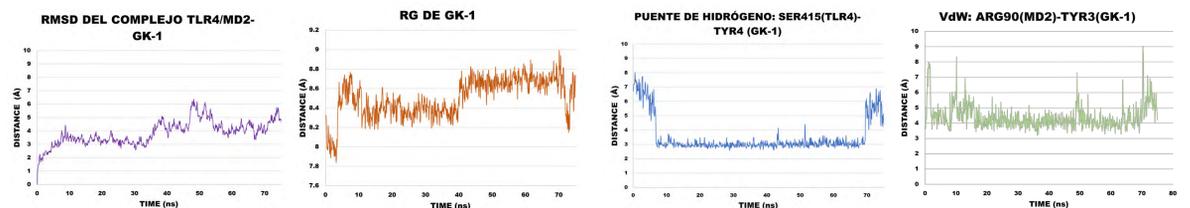
**Eta in silico :**



**Figura 3. Estructura 3D de GK-1:** La estructura tridimensional (3D) predicha de GK-1 (color cian) por PedFold tiene un valor de energía sOPEP de -15.9909 kcal/mol<sup>2</sup>. Posteriormente se refinó por DM (color morado).



**Figura 4. Docking molecular de TLR4/MD2 con GK-1 y LPS:** Los resultados de Docking molecular muestran que GK-1 (a) y LPS (b) se une al sitio de activación del complejo TLR4/MD2. GK-1 obtuvo un valor de acoplamiento de -302.60. Mientras que el LPS el valor de acoplamiento es de -433.79. En color gris claro (cadena A), y gris (cadena B), representa la estructura TLR4, en color tan (cadena C) y en rosa (cadena D) muestra a MD2, en color púrpura se ilustra GK-1 y en naranja se observa LPS.



**Figura 5. RMSD y RG:** Se calculó el RMSD del complejo TLR4/MD2-GK-1, mostrando que el complejo es móvil. También se calculó el RG del péptido GK-1 mostrando que es un péptido muy móvil.

**Figura 6. Interacciones intermoleculares de GK-1 y el complejo TLR4/MD2:** El puente de hidrógeno formado entre la TLR4 y GK-1, así como la Fuerza de VdW integrado por MD2 y GK-1 son constantes.

### CONCLUSIONES

GK-1 se une al mismo sitio de unión que LPS, siendo capaz de activar al complejo TLR4/MD2. GK-1 forma interacciones intermoleculares constantes en los aminoácidos Ser415 y Arg90, los cuales son claves para la activación del complejo TLR4/MD2. Los agonistas de TLR4 son importantes en la inducción de procesos proinflamatorios, para ser utilizados como biofármacos y adyuvantes. Activa células a través de TLR4, pero este es un solo mecanismo que participa GK-1.

### PERSPECTIVAS

Se ha encontrado que los TLR's se encuentran sobreexpresados en diferentes tipos de cáncer. En particular agonistas sintéticos de TLR4 como, GLA-60 y DT-5461, inhibe metástasis pulmonares y hepáticas en modelos murinos de linfoma y de melanoma. La actividad anti metastática de GK-1 podría estar mediada por la activación celular vía TLR4.

### REFERENCIAS

- Montero L, Cervantes-Torres J, Sciutto E, Fragoso G. Helminth-derived peptide GK-1 induces Myd88-dependent pro-inflammatory signaling events in bone marrow-derived antigen-presenting cells. *Mol Immunol.* 2020 Dec;128:22-32.
- Deguine J, Barton GM. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep.* 2014 Nov 4;6:97.
- Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure.* 2011 Apr 13;19(4):447-59.
- Wang Y, Su L, Morin MD, Jones BT, Whitby LR, Surakattula MM, Huang H, Shi H, Choi JH, Wang KW, Moresco EM, Berger M, Zhan X, Zhang H, Boger DL, Beutler B. TLR4/MD-2 activation by a synthetic agonist with no similarity to LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Feb 16;113(7):E884-93.
- Shetab Boushehri MA, Lamprecht A. TLR4-Based Immunotherapeutics in Cancer: A Review of the Achievements and Shortcomings. *Mol Pharm.* 2018 Nov 5;15(11):4777-4800.