

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA DA COMPLEXAÇÃO DO
RECEPTOR TIPO *TOLL* 4 HUMANO A MD-2**

Carla Carvalho de Aguiar

Porto Alegre – Brasil
Fevereiro de 2013

**CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA DA COMPLEXAÇÃO DO RECEPTOR TIPO *TOLL* 4
HUMANO A MD-2**

Carla Carvalho de Aguiar

Dissertação de mestrado elaborada no Grupo de Bioinformática Estrutural do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do professor doutor

Hugo Verli

Porto Alegre – Brasil
Fevereiro de 2013

**CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA DA COMPLEXAÇÃO DO RECEPTOR TIPO *TOLL* 4
HUMANO A MD-2**

Carla Carvalho de Aguiar

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Hugo Verli (Centro de Biotecnologia - UFRGS) (Presidente)

Guido Lenz (Centro de Biotecnologia - UFRGS)

Gustavo Fioravanti Vieira (PPGBM - UFRGS)

Ernesto Raúl Caffarena (Fiocruz)

Claudia Lemelle Fernandes (Centro de Biotecnologia - UFRGS) (Suplente)

Esta dissertação foi realizada sob a orientação do Professor Doutor Hugo Verli, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, junto ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FICHA CATALOGRÁFICA

CARVALHO DE AGUIAR, Carla.

**Caracterização da dinâmica da complexação do receptor tipo *Toll* 4 humano a
MD-2.**

Rio Grande do Sul, UFRGS, Centro de Biotecnologia, 2013.

Dissertação: Mestre em Ciências (Biologia Celular e Molecular)

- | | |
|-----------------------|------------------------|
| 1. Dinâmica Molecular | 2. Sistema Imune Inato |
| 3. TLRs | 4. Biologia Estrutural |

I. Hugo Verli

II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia

III. Títulos

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a Deus, pela graça da vida e pela companhia em cada passo que dou, iluminando e gratificando meu caminho.

Ao meu orientador, Hugo Verli, que acreditou em meu potencial e me possibilitou a realização deste trabalho com toda a liberdade e confiança necessária para a sua completa exequibilidade.

Aos professores Charley Staats e Fernanda Staniscuaski, membros de minha comissão de acompanhamento, por todas as sugestões e real interesse no sucesso do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À CPG, por auxiliar tanto no meu crescimento individual, quanto conduta profissional.

Aos colegas de laboratório por todos os conselhos e apoio, tanto profissional, quanto emocional.

Aos profissionais Silvia Regina Centeno e Luciano Saucedo por toda a ajuda e competência em tudo quanto estiveram presentes.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

À família, por todo o apoio, suporte e amor que sempre me foi dedicado, em especial aos meus pai, bênçãos em minha vida e, ao Rick, meu grande companheiro.

Aos amigos, por colorirem minha jornada, tornando a vida muito mais divertida e sua finalidade mais óbvia.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Albert Schweitzer

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
ÍNDICE DE FIGURAS	15
ÍNDICE DE TABELAS	16
1 Introdução	17
1.1 Sistema Imunológico	17
1.1.1 A resposta Imune Inata	18
1.1.2 A resposta Imune Adaptativa	20
1.2 Receptores tipo <i>Toll</i>	22
1.2.1 Bases históricas	22
1.2.2 A Família de Receptores tipo <i>Toll</i>	23
1.2.3 Estrutura dos TLRs	25
1.3 hTLR4	30
1.3.1 Complexo de Reconhecimento de ligantes pelo hTLR4	33
1.3.1.1 Domínio Extracelular	33
1.3.1.1.1 MD-2	35
1.3.1.2 Domínio Transmembrana	37
1.3.1.3 Domínio Intracelular	38
1.4 A Dinâmica Molecular na caracterização conformacional de biomoléculas ...	39
1.4.1 Análises dos dados de simulações de DM	42
1.4.1.1 Desvio médio quadrático (Root Mean Square Deviation - RMSD)	42

1.4.1.2 Raio de Giro (Radius of Gyration - Rg).....	44
1.4.1.3 Flutuação média quadrática (Root Mean Square Fluctuation - RMSF) 45	
2 Objetivos	46
3 Metodologia.....	47
3.1 Programas utilizados	47
3.2 Construção dos sistemas	47
3.3 Simulações de DM.....	51
3.4 Validação das simulações de DM.....	52
4 Resultados	53
4.1 Preâmbulo	53
Discussão Geral.....	90
4.2 Validação dos estudos de DM com o hTLR4	90
4.3 Importância dos estudos com o hTLR4.....	92
5 Conclusões	95
6 Perspectivas.....	96
7 Referências Bibliográficas.....	97
8 Apêndice	109
8.1 Apêndice A	109
<i>Curriculum Vitæ</i>	118

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
BPTI	Inibidor de tripsina pancreática bovina (<i>Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor</i>)
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
cTLR	Receptores tipo <i>Toll</i> de camundongos
DAMPs	Padrões moleculares associados a dano (<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>)
DM	Dinâmica Molecular
dsRNA	RNA fita dupla
<i>dToll</i>	Receptores <i>Toll</i> de <i>Drosophila</i>
ECD	Ectodomínio
GAGs	Glicosaminoglicanos
HMGB1	proteína de alta mobilidade box 1 (<i>High-Mobility group box 1 protein</i>)
HSPs	Proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Protein</i>)
hTLR	Receptor tipo <i>Toll</i> humano
hTLR4	Receptor tipo <i>Toll</i> 4 humano
kDa	Kilodaltons
LBP	Proteína de ligação a LPS (<i>LPS Binding Protein</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Repetições ricas em leucina (<i>Leucine Reach Repeats</i>)
Mal	<i>MyD88-adaptor-like</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
MD-2	Fator de diferenciação mielóide 2 (<i>Myeloid Differentiation factor-2</i>)

NK	<i>Natural Killers</i>
ns	Nanossegundos
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PDB	Banco de dados de estruturas de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PDB ID	Código de Identificação no PDB
PME	<i>Particle-Mesh Ewald</i>
ps	Picossegundos
polyI:C	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões (<i>Pattern Recognition Receptors</i>)
RE	Retículo Endoplasmático
ssRNA	RNA fita simples
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>
TIR	Receptor <i>Toll</i> -Interleucina 1 (<i>Toll-Interleucin 1 Receptor</i>)
TLRs	Receptores tipo <i>Toll</i> (<i>Toll-Like Receptors</i>)

RESUMO

Os receptores tipo *Toll* desempenham um importante papel na resposta imune inata, reconhecendo tanto padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), quanto padrões moleculares associados a danos (DAMPs), liberados sob condições de injúria ou estresse celular. O receptor tipo *Toll* 4 humano (hTLR4), associado ao seu co-receptor, o fator de diferenciação mielóide 2 (MD-2), forma um heterodímero caracterizado como responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), derivados de bactérias Gram-negativas. Nestes casos, sabe-se que o MD-2 reconhece LPS e promove a dimerização do complexo hTLR4 - MD-2 - LPS, promovendo a sinalização intracelular. Já foi reportada a ausência da associação hTLR4 a MD-2, no reconhecimento de outros ligantes por hTLR4, e, nesses casos, pouco é conhecido a respeito das mudanças estruturais e conformacionais sofridas por este receptor. No presente estudo, empregando a técnica de simulação por dinâmica molecular, foram exploradas as propriedades dinâmicas do complexo de reconhecimento de LPS, hTLR4 - MD-2, bem como investigou-se as implicações da presença do co-receptor para a biologia estrutural do hTLR4. Os resultados mostram que o receptor apresenta um movimento do tipo pinça, o qual leva a um estado final mais aberto da estrutura em forma de ferradura. Ademais, a estabilidade desta estrutura parece ser influenciada pela presença do co-receptor, MD-2.

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs) play an important role in innate immunity recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), as also damage-associated molecular patterns (DAMPs), released after cellular injury or stress. Human Toll-Like Receptor 4 (hTLR4) and its co-receptor, myeloid differentiation factor 2 (MD-2), as a heterodimer, is a well-known complex of Gram-negative bacteria lipopolysaccharide (LPS) recognition. In this process, MD-2 recognizes LPS and promotes the dimerization of the complex hTLR4 - MD-2 - LPS, initiating an intracellular immune signaling. Moreover, it has been reported that hTLR4 can also act in the absence of MD-2, in the case of other ligands recognition, and, in these cases, little is known about the structural and conformational changes that hTLR4 structure underwent. In the current study, employing molecular dynamics simulations, we had explored the dynamical properties of the hTLR4 - MD-2 complex and investigated the implications of the co-receptor complexation to the structural biology of hTR4. We observed that the receptor showed a tweezers-like movement, leading to a more opened final state of its horseshoe-shaped structure. Additionally, the stability of this structure seems to be influenced by the presence of the co-receptor, MD-2.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imunidade Inata x Imunidade Adaptativa.	18
Figura 2. Estrutura do ECD dos TLRs	26
Figura 3. Estrutura do LPS	31
Figura 4. Estrutura do ECD de hTLR4.....	33
Figura 5. Estrutura do MD-2 ligado a LPS	35
Figura 6. Interação entre hTLR4 e MD-2	36
Figura 7. Região transmembrana de hTLR4	37
Figura 8. Representação esquemática do complexo hTLR4 - MD-2, responsável pelo reconhecimento de LPS em sistemas biológicos	39
Figura 9. Funções de energia que compõem o campo de força GROMOS	41
Figura 10. Exemplo de dado gerado por análise de RMSD	43
Figura 11. Exemplo de dado gerado por análise de Raio de giro.....	44
Figura 12. Exemplo de dado gerado por análise de RMSF.....	45
Figura 13. Estrutura cristalográfica do complexo hTLR4 - MD-2 - LPS.....	48
Figura 14. Sequência e estrutura das proteínas constituintes do cristal 3FXI (hTLR4 e MD-2).....	49
Figura 15. Sistemas simulados. Representação esquemática dos cinco sistemas estudados	50
Figura 16. Esquema das etapas que compõem as simulações de DM a 310 K	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais ligantes descritos para os TLRs	24
Tabela 2. Estruturas Cristalográficas do ECD de TLRs disponíveis no PDB	29
Tabela 3. Estruturas Cristalográficas do domínio TIR de TLRs disponíveis no PDB..	30
Tabela 4. Principais ligantes descritos para o hTLR4.....	32
Tabela 5. Conteúdo de Estrutura Secundária no hTLR4.....	34
Tabela 6. Dados comparativos de análises das duplicatas para o receptor hTLR4 nos diferentes sistemas em que este se encontrava e para as duas cadeias do mesmo.	91
Tabela 7. Dados comparativos de análises das duplicatas para a proteína MD-2 nos diferentes sistemas em que esta se encontrava e para as duas cadeias da mesma.	92

1 Introdução

1.1 Sistema Imunológico

Os organismos multicelulares desenvolveram um complexo sistema de defesa utilizado para repelir “elementos estranhos”, dito sistema imunológico (sistema imune). Estes elementos abrangem um amplo espectro de moléculas, que podem tanto estar presentes em microrganismos com potencial patogênico como também em pequenas substâncias químicas que adentram o organismo hospedeiro (organismo sujeito à infecção) e são reconhecidas como estranhas ou não-próprias (Abbas, 2012). Assim, ao longo da evolução, o sistema imune sofreu uma série de mudanças impostas por pressão seletiva de uma vasta gama de microrganismos infecciosos e, como resultado, os organismos multicelulares desenvolveram vários mecanismos de defesa contra estes potenciais patógenos (Medzhitov *et al.*, 1997).

No entanto, não apenas aqueles elementos identificados como não-próprios do hospedeiro possuem capacidade causativa de dano celular e tecidual e, portanto, de ativação da resposta imune. Alguns eventos de estresse celular, como calor, frio, radiação, contato com agentes químicos, entre outros, podem também levar a condições de injúria celular (Bianchi, 2007). Essas condições podem culminar na lise celular e liberação/secreção de algumas moléculas que funcionam como sinalizadoras de perigo no ambiente celular, promovendo a ativação de agentes do sistema imune e consequente inflamação (Bianchi, 2007; Harberts & Gaspari, 2013). Ainda, algumas moléculas como glicosaminoglicanos (GAGs) já foram descritas como atuantes nesse tipo de ativação, em que, a presença das mesmas de maneira altamente distribuída em uma grande diversidade de organismos, desde invertebrados a vertebrados (Medeiros *et al.*, 2000), evidencia o papel evolutivo também dessas moléculas na modulação da resposta imune.

Nos vertebrados mandibulados (gnatostomados) o sistema de defesa é mediado por dois mecanismos distintos, tanto pelo seu período, quanto pela sua forma de ação (Krimbell *et al.*, 2001). Nesses diferentes mecanismos ocorre a diferenciação entre elementos próprios do organismo daqueles não-próprios (Janeway *et al.*, 1992) através de duas diferentes repostas: a resposta imune inata (também dita inicial ou natural) e a resposta imune adquirida (também dita tardia, específica ou adaptativa) (Krimbell *et al.*, 2001) (Figura 1).

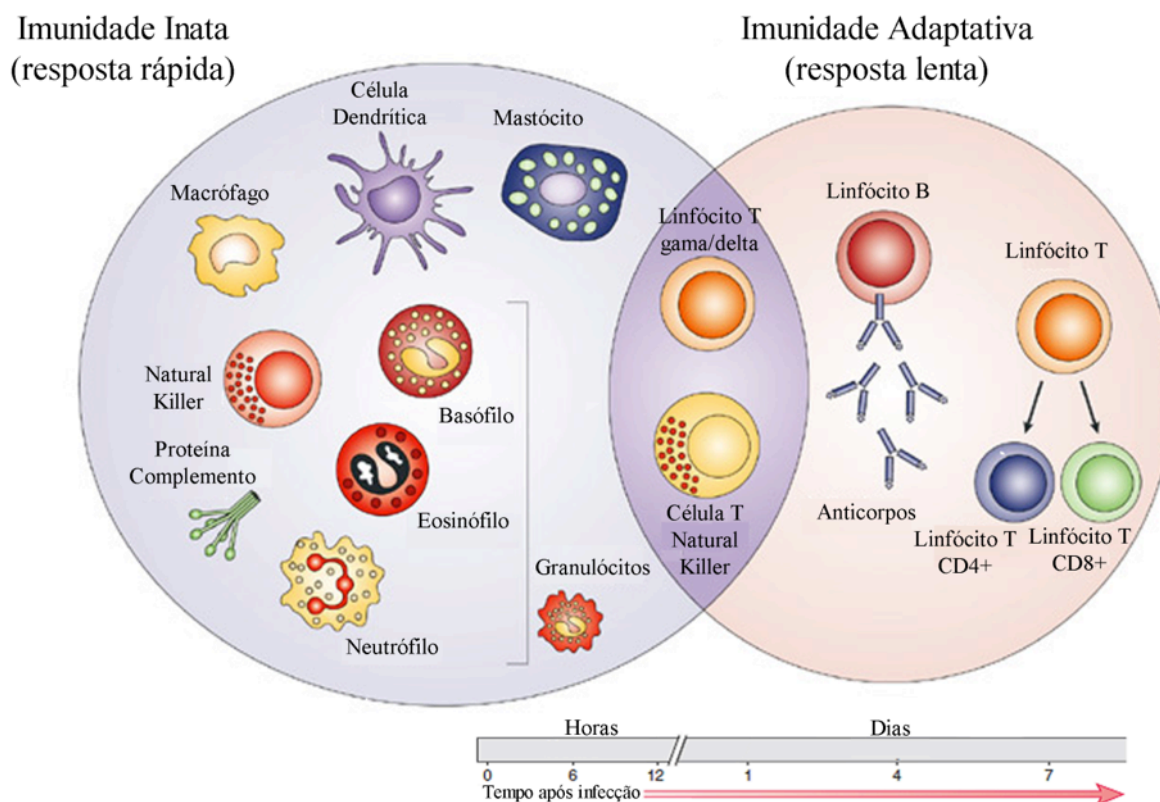


Figura 1. Imunidade Inata x Imunidade Adaptativa. Comparação esquemática do maquinário celular envolvido nas respostas imune, inata (mostrada em destaque lilás) e adaptativa (em destaque rosa), bem como a relação de tempo de início e duração aproximada das mesmas (adaptado de Dranoff, 2004 e Abbas, 2012).

A resposta Imune inata atua na primeira linha de defesa contra patógenos, sendo considerada quase instantânea após a situação de infecção, enquanto a resposta imune adaptativa, por outro lado, pode levar de dias a semanas para atingir sua máxima eficácia (Krimbel & Beutler, 2001; Pancer & Cooper, 2006; Dranoff, 2004). Ainda, para muitos organismos o sistema de defesa é ditado apenas pelos mecanismos da resposta imune inata (Hoffmann & Reichhart, 2002; Beutler, 2004).

1.1.1 A resposta Imune Inata

A resposta imune inata surgiu muito antes da separação dos vertebrados e invertebrados e, para muitos organismos multicelulares, ela ainda é a única forma de defesa (Krimbell *et. al.*, 2001; Hoffman *et. al.*, 2002). A maquinaria deste tipo de resposta é altamente conservada, desde plantas e insetos a mamíferos (Akira *et al.*, 2006), constituindo a primeira linha de defesa contra patógenos, desempenhada por

células naturalmente constituintes do sistema imune. Este fato permite que essa resposta seja rapidamente ativada e, assim, considerada essencialmente instantânea, uma vez que seus operantes já são preexistentes à possível situação de infecção (Akira *et al.*, 2006).

Neste tipo de resposta há a dependência de receptores ditos de reconhecimento de padrões (os PRRs), os quais são codificados na linhagem germinativa e são capazes de identificar produtos derivados de células lesadas, os ditos DAMPS (padrões moleculares associados a dano), bem como microrganismos e seus produtos, os ditos PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos (Bianchi, 2007; Medzhitov & Janeway, 2002).

Os DAMPs são sinais endógenos de perigo que alertam o sistema imune quanto a morte celular não programada, invasão de microrganismos e/ou são liberados em resposta ao estresse. Essas moléculas podem tanto iniciar quanto propagar a resposta imune, na presença ou ausência de patógenos. Exemplos desses DAMPs podem ser encontrados no núcleo e citoplasma (como as HMGB1 - proteína de alta mobilidade box 1), na matriz extracelular (como o ácido hialurônico) e em exossomos (como as HSPs - proteínas de choque térmico) (Sasisekharan *et al.*, 2002; Erridge, 2010; Tang *et al.*, 2012). Adicionalmente, já foi visto que o acréscimo dessas moléculas no soro de pacientes está intimamente associado a doenças inflamatórias como sepse, artrite, arterosclerose, lupus sistêmico eritromatoso e doença de Crohn, evidenciando a potencialidade das mesmas na ativação da inflamação - resposta imune (Sasisekharan *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2012).

Os PAMPs, por sua vez, são estruturas moleculares essenciais à fisiologia de microrganismos (ex.: peptidoglicanos e lipopolissacrídeos (LPS) - essenciais a integridade da forma celular bacteriana) e ausentes nos organismos hospedeiros (Akira *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2012). Estas estruturas são altamente conservadas evolutivamente e compartilhadas por classes de microrganismos, consistindo-se em assinaturas moleculares (ex.: peptidoglicanos: bactérias Gram-positivas; LPS: bactérias Gram-negativas; mananas: fungos). A estratégia evolutiva de reconhecimento de assinaturas moleculares, adotada pelo sistema imune inato, permitiu tanto o reconhecimento de uma ampla gama de patógenos (já que identificam vários PAMPs e os mesmos estão presentes em diversos microrganismos), quanto possibilitou a manutenção de um número “limitado” de

receptores codificados na linhagem germinativa para o reconhecimento destes diversos patógenos (uma vez que reconhecem padrões conservados entre classes de microrganismos) (Medzhitov *et al.*, 1997).

A resposta tanto a PAMPs quanto a DAMPs costuma ser semelhante já que, ambas as condições podem ocorrer em consequência à infecção por patógenos e, além disso, por ambas resultarem em lesão celular e tecidual (Bianchi, 2007). Ademais, neste tipo de resposta (inata), os PRRs costumam responder, essencialmente, da mesma maneira a sucessivas infecções (Abbas, 2012; Tang *et al.*, 2012).

Os PRRs podem ser expressos tanto em superfícies celulares, em compartimentos intracelulares, ou secretados na circulação e fluidos teciduais e, mediante a identificação de ligantes exercem funções de opsonização, ativação do sistema complemento e cascatas de coagulação, fagocitose, ativação de vias de sinalização pró-inflamatória e indução de apoptose (Hoffman *et al.*, 2002; Medzhitov, 2001). Os primeiros PRRs descritos foram os receptores tipo *Toll* (TLRs), os quais configuram a maior classe desse tipo de receptores em *Drosophila* e mamíferos (Chang, 2010; Kawai & Akira, 2011; Liu *et al.*, 2012), sendo os mais bem caracterizados tanto em termos de reconhecimento de PAMPs, quanto pela subsequente ativação das vias de resposta (Vanderbon *et al.*, 2012).

Os mecanismos descritos constituem o aparato do tipo de resposta imune mais universal, rápido e, sob algumas avaliações, mais importante das formas de resposta (uma vez que para muitos organismos, a sobrevivência é ditada apenas por estes mecanismos) (Beutler, 2004). Todavia, em adição à resposta imune inata, vertebrados mandibulados desenvolveram um sistema de reconhecimento e eliminação de patógenos mediado primariamente por linfócitos, o qual é dito, resposta imune adaptativa (Pancer & Cooper, 2006).

1.1.2 A resposta Imune Adaptativa

Os vertebrados mandibulados desenvolveram um sistema alternativo de resposta e eliminação de patógenos, conhecido como resposta imune adaptativa (Litman *et al.*, 2010). Este tipo de resposta é baseada em receptores que são gerados por mecanismos somáticos durante a ontogenia de cada organismo em individual, sendo estimulada pela exposição a agentes infecciosos (Medzhitov *et al.*,

1997). Por isso, a magnitude e a capacidade defensiva nesse tipo de resposta aumentam conforme exposições posteriores a um microrganismo em particular e é, por isso, dita imunidade adaptativa. Este tipo de resposta é capaz de distinguir entre os diferentes microrganismos e moléculas, incluindo até mesmo aqueles que apresentam grande semelhança (como diferentes patógenos dentro de uma mesma classe) sendo, por isso, também chamada de imunidade específica (Beutler, 2004; Litman *et al.*, 2010).

A resposta imune adquirida é iniciada após o reconhecimento do agente invasor pelo sistema imune inato, podendo levar dias ou até semanas para atingir sua máxima eficácia (Krimbell *et al.*, 2001). Este tipo de resposta é mediada por linfócitos, os quais evoluíram para expressar uma grande variedade de receptores - as imunoglobulinas (ou anticorpos, secretados por células derivadas dos linfócitos B-plasmócitos) e os receptores T - que são capazes de reconhecer os mais diversos patógenos que o hospedeiro possa encontrar (Kimbrell *et al.*, 2001). A ação da resposta imune adaptativa reside na geração de um altamente diverso e randômico repertório de receptores de antígenos, seguidos de seleção clonal e expansão daqueles receptores com especificidade relevante (Medzhitov, 2001).

Os linfócitos B são os principais agentes da resposta imune humoral, ou seja, aquela em que há ação de anticorpos; já os receptores T (também ditos linfócitos ou células T) mediam o processo de imunidade celular, em que são responsáveis pelo extermínio de microrganismos intracelulares (por sua eliminação ou por morte da célula infectada) (Litman *et al.*, 2010; Abbas, 2012).

Os mecanismos utilizados pela resposta imune adaptativa são capazes de conferir a chamada memória imunológica, permitindo que em um próximo contato com o organismo invasor a resposta ao mesmo seja acelerada, o que confere uma grande vantagem nesse tipo de resposta. No entanto, em um primeiro contato, essa resposta tem a limitação de, devido ao processo de expansão e diferenciação dos clones em células efetoras, ser um tipo de resposta que pode levar dias ou até semanas para atingir máxima eficácia (Medzhitov, 2001).

Tanto a resposta imune inata quanto a resposta imune adaptativa são extremamente importantes e complementares sendo, inclusive, difícil delimitar quando uma termina e a outra se inicia (Beutler, 2004; Takeda & Akira, 2005; Pancer & Cooper, 2006). Juntos, estes mecanismos constituem o aparato ideal de linha de

defesa contra microrganismos e demais agentes invasores em vertebrados (Krimbel & Beutler, 2001; Hoffmann & Reichhart, 2002; Vivier *et al.*, 2011).

1.2 Receptores tipo *Toll*

Os receptores tipo *Toll* (TLRs) são proteínas que atuam como PRRs, os quais reconhecem diferentes PAMPs e levam à ativação tanto da iniciação da resposta imune inata, quanto da resposta imune adaptativa (Kumagai & Akira, 2010; Kawai & Akira, 2011). Estes receptores encontram-se presentes em uma grande variedade de organismos, desempenhando um importante papel de ativação da resposta imune contra patógenos tanto em vertebrados quanto em invertebrados (Kimbrel & Beutler, 2001; Gangloff *et al.*, 2008; Chang, 2010).

1.2.1 Bases históricas

Os TLRs foram assim nomeados por apresentarem homologia aqueles receptores de semelhante estrutura e função em *Drosophila melanogaster*, os receptores *Toll* (Anderson *et al.*, 1985; Chtarbanova & Inler, 2011). O termo *Toll*, que no vocabulário alemão é definido como impressionante, fantástico, foi empregado por Nüsslein-Volhard tamanha foi a impressão da pesquisadora frente aos resultados que ali observava, os quais indicavam que aqueles genes estavam envolvidos no estabelecimento do eixo dorso-ventral de embriões de *Drosophila* (Anderson *et al.*, 1985).

Em 1996, Lemaitre e colaboradores observaram que moscas *Drosophila* mutantes para o gene *Toll* eram altamente suscetíveis a infecções por fungos e descreveram estas proteínas como também envolvidas na imunidade destas moscas (Lemaitre *et al.*, 1996).

Os TLRs foram descobertos um ano depois quando, em 1997, verificou-se a existência de um receptor homólogo ao receptor *Toll* de *Drosophila* em humanos (Medzhitov *et al.*, 1997), o *hToll*. Suportando este achado, alguns anos depois, Beutler e colaboradores descobriram que esses receptores em mamíferos, agora já ditos TLRs, desempenhavam importantes funções no sistema imune e, ainda, que mutações no gene *Tlr4*, codificante para a proteína TLR4, gerava mutantes não

responsivos a LPS, endotoxina constituinte de bactérias Gram-negativas (Poltorak *et al.*, 1998).

Estas descobertas permitiram um maior conhecimento acerca do aparato envolvido no reconhecimento de patógenos em insetos e mamíferos, bem como verificar que tais mecanismos, utilizados por grupos filogeneticamente distantes, estão proximamente relacionados (Chang, 2010).

1.2.2 A Família de Receptores tipo *Toll*

Após a caracterização do primeiro TLR em mamíferos, o TLR4, várias outras proteínas estruturalmente relacionadas a esse receptor foram identificadas e denominadas TLRs (Takeda & Akira, 2005). Até o momento, treze TLRs parálogos foram identificados em mamíferos. Dentre eles, os receptores TLR1 a TLR10 sabe-se que são expressos em humanos (hTLRs), apesar da função do hTLR10 ainda não ter sido elucidada (Hopkins & Sriskandan, 2005; Nyman *et al.*, 2008; Govindaraj *et al.*, 2011). Já os receptores TLR11 a TLR13, não são expressos em humanos mas sabe-se que estão presentes em camundongos (cTLR). Ainda, o gene do TLR11 encontra-se codificado no genoma humano, mas parece ser não-funcional; em camundongos este receptor está relacionado ao reconhecimento de parasitas do filo *Apicomplexa* (Chang, 2010; Govindaraj *et al.*, 2011).

Os hTLRs1-9 estão envolvidos no reconhecimento de DAMPs e PAMPs altamente diversos, estes últimos presente em bactérias, fungos, vírus e protozoários (Tabela 1).

Tabela 1. Principais ligantes descritos para os TLRs

TLRs	Principais Ligantes	Origem	Referências
1/2	lipopeptídeos tri-acilados	Bacteriana (Gram-positivas)	Jin <i>et al.</i> , 2007; Kang <i>et al.</i> , 2009; Chang, 2010
2	peptidoglicanos polissacarídeos HMGB1	Fúngica Endógena	Jin <i>et al.</i> , 2007 Chang, 2010 Harberts & Gaspari, 2013
2/6	lipopeptídeos di-acilados peptidoglicanos zimosana	Bacteriana (Gram-positivas) Fúngica	Jin <i>et al.</i> , 2007; Gay & Gangloff, 2007; Kang <i>et al.</i> , 2009 Kawai & Akira, 2011
3	dsRNA polyI:C	Viral	Bell <i>et al.</i> , 2005; Leonard <i>et al.</i> , 2008; Liu <i>et al.</i> , 2008;
4	LPS polissacarídeos HSPs fibronectinas heparan sulfato	Bacteriana (Gram-negativas) Fúngica Endógena	Park <i>et al.</i> , 2009; Erridge, 2010 Figueiredo <i>et al.</i> , 2012 Erridge, 2010 Beg, 2002 Brunn <i>et al.</i> , 2005
5	flagelina	Bacteriana	Zhou <i>et al.</i> , 2012
7 8	ssRNA	Viral	Gay & Gangloff, 2008; Govindaraj <i>et al.</i> , 2011
9	CpG-DNA não metilado histonas	Viral Bacteriana de Protozoários Endógena	Kumagai <i>et al.</i> , 2009 Harberts & Gaspari, 2013
10	Desconhecida		Nyman <i>et al.</i> , 2008

Os membros da família de TLRs são expressos diferencialmente em uma grande variedade celular e tecidual, incluindo tanto células do sistema imune inato (como monócitos e células dendríticas) quanto linfócitos do sistema imune adaptativo, além de outras células não constituintes do sistema imune (como queratinócitos ou células endoteliais) (Hopkins & Sriskandan, 2005; Chang, 2010). De acordo com suas funções de reconhecimento, estes receptores podem tanto estar localizados em membranas celulares, como é o caso daqueles receptores que reconhecem patógenos extracelulares (como os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6, que estão envolvidos, principalmente, no reconhecimento de PAMPs associados a superfícies bacterianas) (Takeda & Akira, 2005), quanto ser encontrados em compartimentos intracelulares (endossomos, lisossomos ou RE), como é o caso daqueles receptores que reconhecem patógenos intracelulares (como os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 que reconhecem, principalmente, ácidos nucléicos) (Gay & Gangloff, 2007; Blasius & Beutler, 2010; Kang & Lee, 2011).

Todos estes ligantes dos TLRs são extremamente diversos, variando tanto em suas composições quanto formas e tamanhos. A compreensão exata dos mecanismos-chave que possibilitam a discriminação de cada um deles pelos diferentes receptores tem sido um importante campo de estudo da imunologia (Gay & Gangloff, 2008; Chang, 2010).

1.2.3 Estrutura dos TLRs

Atualmente, estão disponíveis trinta e duas estruturas cristalográficas de TLRs (do domínio TIR ou ECD, com ou sem ligantes) no banco de dados de estruturas de proteínas (PDB). Estas estruturas permitiram um maior conhecimento acerca da biologia estrutural dessa família de receptores, bem como refletiram a alta conservação estrutural nas mesmas (Govindaraj, 2011).

Os TLRs pertencem à família de glicoproteínas transmembrana do tipo I, o que lhes confere a característica de possuírem uma sequência sinal para secreção ao lúmen do retículo endoplasmático (RE) seguida por um domínio extracelular (ectodomínio– ECD) solenóide (espiralado), com um típico enovelamento semelhante à ferradura (ou *horseshoe-like*) (Jackson *et al.*, 1993; Leulier & Lemaitre, 2008) (Figura 2A).

Este ECD é constituído, tipicamente, de cerca de 16 a 28 repetições ricas em leucina (LRRs) (Gay & Gangloff, 2008; Manavalan *et al.*, 2011). Cada LRR contém, aproximadamente, de 20 a 30 aminoácidos, bem como as sequências consenso $xLxxLxLxx$ (região côncava, interna) e $x\phi xx\phi xxxxFxxLx$ (região convexa, externa), em que X representa qualquer aminoácido e ϕ um resíduo hidrofóbico. As leucinas presentes nas sequências consenso também podem, em alguns casos, ser substituídas por outros aminoácidos hidrofóbicos, tais como valina, isoleucina e fenilalanina (Kang & Lee, 2011). Estas repetições formam tipicamente fitas β na região côncava da proteína (as quais representam o núcleo hidrofóbico da mesma e, constituem uma grande folha β paralela), e elementos variados na região convexa (Figura 2) (Bell *et al.*, 2003; Akira *et al.*, 2006; Leulier & Lemaitre, 2008; Chang, 2010). Há ainda, nessas LRRs, resíduos de asparagina (que podem ser substituídas por outros resíduos capazes de doar hidrogênio como treonina, serina e cisteína) (Figura 2B) próximos aos motivos das regiões côncava e convexa, os quais formam contínuas ligações de hidrogênio com o grupo carbonil de fitas β adjacentes em toda a proteína, resultando em uma rede de asparaginas. Essa rede de asparaginas é descrita como importante na manutenção da forma geral do ECD dos TLRs, o qual está intimamente envolvido no reconhecimento de ligantes por estes receptores (Kang & Lee, 2011; Manavalan *et al.*, 2011).

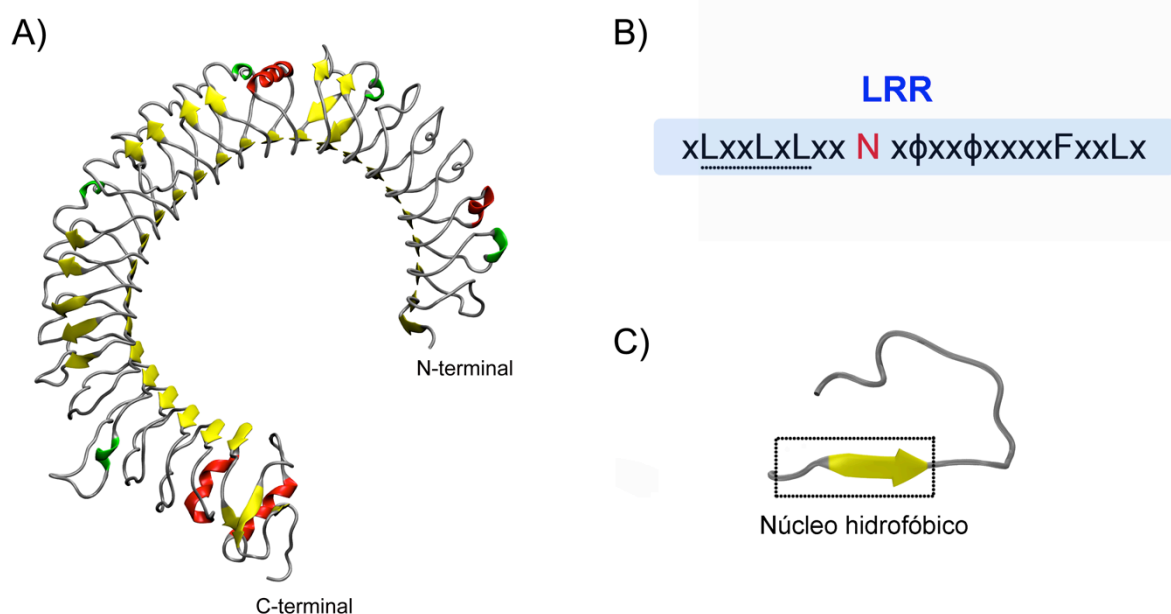


Figura 2. Estrutura do ECD dos TLRs. (A) Em cartoon é representado o típico enovelamento do ECD dos TLRs. A estrutura apresentada é do TLR3 (PDB ID 2A0Z) (Bell *et al.*, 2005) e, foi colorida por estrutura secundária, em que, fitas β são mostradas

em amarelo; α -hélices, em vermelho; hélices 3_{10} , em verde; e alças e voltas, em cinza. Em (B) é mostrada a sequência consenso presente nas LRRs em que X representa qualquer aminoácido e, ϕ um resíduo hidrofóbico. Os resíduos que formam o núcleo hidrofóbico, bem como a asparagina conservada responsável pela formação de uma rede de asparaginas são destacados em linhas pontilhadas e em vermelho, respectivamente. Em (C) é mostrado um exemplo de uma LRR, mostrada em cartoon, colorida por estrutura secundária nos mesmos padrões de cores que em (A). Nesta representação, o núcleo hidrofóbico da mesma é evidenciado em uma caixa.

O ECD dos TLRs pode tanto diretamente ligar-se aos PAMPs quanto estar associado a outras proteínas que desempenharão papel de co-receptores nesse processo, como é o caso do MD-2, envolvido no reconhecimento de LPS por TLR4 (Chang, 2010; Kang & Lee, 2011).

Existem vinte e seis estruturas do ECD de TLRs disponíveis no PDB, das quais quatorze são de humanos. Estas estruturas estão depositadas tanto sob a forma de complexos associados a ligantes, quanto apresentam apenas a estrutura cristalográfica do receptor (Tabela 2).

A porção intracelular dos TLRs, por sua vez, está envolvida no processo de sinalização intracelular e apresenta estrutura homóloga ao receptor de Interleucina-1, por isso é dita domínio do receptor *Toll*-Interleucina 1 (domínio TIR) (Nyman *et al.*, 2008; Nunez Miguel *et al.*, 2007). O domínio TIR apresenta estrutura globular formada por hélices e fitas e é conectado ao ECD por meio de um domínio transmembrana, predito como formador de uma α -hélice única (Kang & Lee, 2011; Manavalan *et al.*, 2011).

No processo de reconhecimento de ligantes (pelo ECD dos TLRs) e resposta (através de sinalização pelo domínio TIR) sabe-se que, mediante a ligação do ECD ao PAMP, há um rearranjo do TLR envolvido nesse processo, induzindo a dimerização do mesmo. Essa dimerização pode ocasionar tanto a formação de homodímeros, como é o caso dos receptores TLR3 (Liu *et al.*, 2008; Gangloff, 2012) e TLR5 (Zhou *et al.*, 2012), quanto a formação de heterodímeros, como o que ocorre com os receptores TLR1-TLR2 (Jin *et al.*, 2007) e TLR2-TLR6 (Kang *et al.*, 2009).

O mecanismo de dimerização associado ao reconhecimento de ligantes pelos TLRs, é proposto como um meio de aproximação das estruturas dos receptores,

promovendo uma aproximação dos domínios TIR dos TLRs envolvidos. Essa aproximação dos domínios intracelulares, por sua vez, induz o recrutamento, no interior celular, de moléculas adaptadoras específicas que também possuem um domínio do tipo TIR (Núñez Miguel *et al.*, 2007; Moresco *et al.*, 2011). As moléculas adaptadoras inicialmente recrutadas, essenciais à transdução de sinal pelos TLRs, são as proteínas MyD88, Mal (Tirap), TRIF (Ticam) e TRAM. Experimentos mostraram que mutações dessas proteínas em camundongos levam à uma maior suscetibilidade a infecção nesses animais (Chang, 2010).

Existem cinco estruturas do domínio TIR de TLRs (todas de humanos) disponíveis no PDB (Tabela 3), os quais estão presentes tanto em sua forma monomérica, quanto formando oligômeros.

Dos diferentes tipos de TLRs descritos, o TLR4 é datado como o primeiro estudado (Medzhitov *et al.*, 1997). Este receptor apresenta uma variedade de ligantes e um diferencial em suas interações com alguns deles, o qual é dado pela associação, em seu ECD, de uma proteína dita sua co-receptora, o MD-2 (Shimazu *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2007).

Tabela 2. Estruturas Cristalográficas do ECD de TLRs disponíveis no PDB.

Os diferentes complexos presentes nas estruturas cristalográficas são evidenciados na primeira coluna, em que Pam3CSK4: lipopeptídeo triacilado sintético; Pam2CSK4: lipopeptídeo diacilado sintético; e (cTLR3)₂ e (hTLR4/MD-2/LPS)₂ representam duas cópias do referido sistema.

TLR	Estrutura (Domínio)	PDB ID	Referência
hTLR2 / hTLR1 / Pam3CSK4	ECD	2Z7X	Jin <i>et al.</i> , 2007
cTLR2		2Z81	Jin <i>et al.</i> , 2007
		2Z82	
		3A7B	
		3A7C	
hTLR2		2Z80	Jin <i>et al.</i> , 2007
cTLR2 / cTLR6 / Pam2CSK4		3A79	Kang <i>et al.</i> , 2009
hTLR3		2A0Z	Bell <i>et al.</i> , 2005
		1ZIW	Choe <i>et al.</i> , 2005
		3ULV	Luo <i>et al.</i> , 2012
cTLR3		3CIG	Liu <i>et al.</i> , 2008
(cTLR3) ₂ / RNA		3CIY	Liu <i>et al.</i> , 2008
hTLR4		2Z62	Kim <i>et al.</i> , 2007
		2Z63	
		2Z66	
		3UL7	
	3ULA	Han <i>et al.</i> , 2012	
	3UL8		
3UL9			
hTLR4 / MD-2	2Z65	Kim <i>et al.</i> , 2007	
cTLR4 / MD-2	2Z64	Kim <i>et al.</i> , 2007	
	3VQ1	Ohto <i>et al.</i> , 2012	
	3VQ2		
(hTLR4 / MD-2 / LPS) ₂	3FXI	Park <i>et al.</i> , 2009	
drTLR5 ¹	3V44	Yoon <i>et al.</i> , 2012	
	3V47		

¹ TLR5 de *Danio rerio* (zebra fish)

Tabela 3. Estruturas Cristalográficas do domínio TIR de TLRs disponíveis no PDB.

TLR	Estrutura (Domínio)	PDB ID	Referência
hTLR1	TIR	1FYV	Xu <i>et al.</i> , 2000
hTLR2		1FYW 1FYX	Xu <i>et al.</i> , 2000
		1O77	Tao <i>et al.</i> , 2002
hTLR10		2J67	Nyman <i>et al.</i> , 2008

1.3 hTLR4

O hTLR4 é um receptor de superfície celular, principalmente expresso em células mielóides (como macrófagos e células dendríticas), mas também em mastócitos, células endoteliais, células NK e linfócitos, células epiteliais, queratinócitos, fibroblastos e até mesmo em células tumorais (Abreu *et al.*, 2002; Chang, 2010; Kim *et al.*, 2012; Reynolds *et al.*, 2012).

O hTLR4 foi primeiramente demonstrado como sendo o receptor de LPS de bactérias Gram-negativas. Posteriormente viu-se que, para essa função, o receptor necessitava da associação à proteína co-receptora MD-2, com a qual forma um complexo fisiológico de reconhecimento de LPS (Poltorak *et al.*, 1998; Shimazu *et al.*, 1999).

O LPS é uma endoxina constituinte da parede externa de bactérias Gram-negativas. Essa molécula apresenta caráter anfipático, sendo composta por três partes: uma porção lipídica A, uma região central constituída por cadeias de carboidratos e uma região altamente variável, o antígeno-O, também constituída por cadeia de carboidratos (Figura 3) (Park *et al.*, 2009; Kang & Lee, 2011).

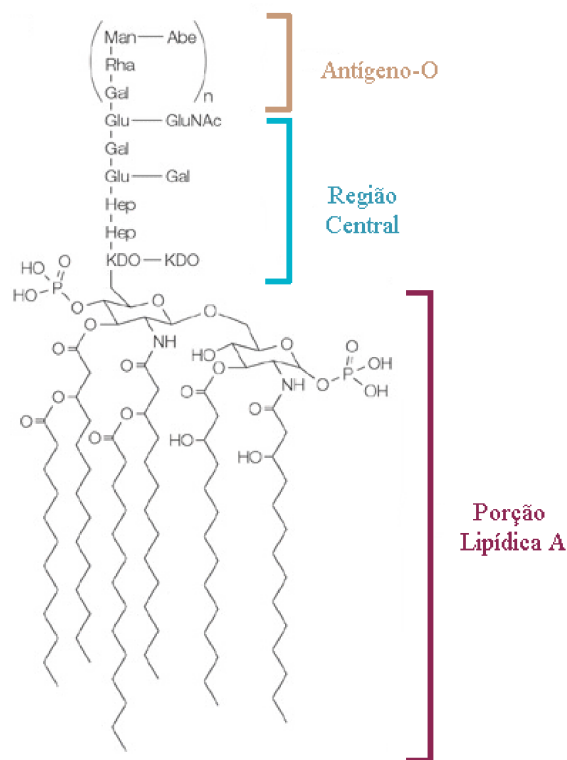


Figura 3. Estrutura do LPS. No esquema são mostradas as porções de um lipopolissacarídeo, em que, na região superior são mostradas as porções constituídas de carboidratos (Antígeno-O e região central) e logo abaixo, a principal porção responsável pelo potencial imunoestimulatório desta molécula, a porção lipídica A.

Estas moléculas, quando liberadas, possuem um alto potencial imunoestimulatório, principalmente devido à porção lipídica A, podendo, inclusive, levar ao desenvolvimento de um choque séptico se a resposta inflamatória resultante for amplificada ou descontrolada (Park *et al.*, 2009; Kang & Lee *et al.*, 2011). No processo de reconhecimento do LPS, duas outras proteínas acessórias ao hTLR4 atuam, transferindo o LPS de membranas biológicas ao complexo hTLR4 - MD-2: a LBP (proteína de ligação a LPS) e o CD14 (*Cluster of differentiation 14*) (Park *et al.*, 2009).

O hTLR4, no entanto, não é capaz de reconhecer apenas LPS. É crescente o número de descrições de potenciais ligantes desse receptor tanto de origem exógena quanto moléculas endógena (Tabela 4) e, em ambos os casos, pouco é conhecido a respeito da maneira pela qual o reconhecimento é feito (Erridge, 2010; Moresco *et al.*, 2011).

Tabela 4. Principais ligantes descritos para o hTLR4.

	Ligantes de hTLR4	Referência
Exógena	LPS	Poltorak <i>et al.</i> , 1998
	BCG (<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>)	Abel <i>et al.</i> , 2002
	PTX (paclitáxel)	Szajnik <i>et al.</i> , 2009
	Polissacarídeos de fungos	Shoham <i>et al.</i> , 2001; Figueiredo <i>et al.</i> , 2012
	Proteína de fusão de RSV (vírus sincicial respiratório)	Hold & El-Omar, 2008;
	Glicoinositolfosfolípídeos	Oliveira <i>et al.</i> , 2004
Endógena	HSPs	Vabulas <i>et al.</i> , 2001; Vabulas <i>et al.</i> , 2002; Roelof <i>et al.</i> , 2006
	HMGB-1	Maroso <i>et al.</i> , 2010
	β -defensina	Biragyn <i>et al.</i> , 2002
	Fibrinogênio	Smiley <i>et al.</i> , 2001
	Fibronectina	Okamura <i>et al.</i> , 2001
	Fet A (glicoproteína de secreção do fígado)	Pal <i>et al.</i> , 2012
	Ácido hialurônico	Termer <i>et al.</i> , 2002
	Heparan sulfato	Johnson <i>et al.</i> , 2002

A estrutura do hTLR4 apresenta um enovelamento altamente conservado evolutivamente, compartilhando características de seus domínios que são mantidas para a família de TLRs (Kang & Lee, 2011).

1.3.1 Complexo de Reconhecimento de ligantes pelo hTLR4

1.3.1.1 Domínio Extracelular

Em seu ECD, o hTLR4 apresenta 631 resíduos de aminoácidos (aa), sendo os primeiros 23 aa constituintes do peptídeo sinal e os demais 608 aa constituintes da estrutura solenóide responsável pelo reconhecimento de ligantes (UniProt ID: O00206). Este domínio possui enovelamento em forma de ferradura, apresentando 21 LRRs (Park *et al.*, 2009). Estas LRRs são altamente conservadas em toda essa família de receptores formando, na região côncava da proteína, folha β (Bell *et al.*, 2003; Leulier & Lamaitre, 2008) (Figura 4). No TLR4, assim como ocorre nos receptores TLR1, TLR2 e TLR6, o comprimento e a conformação dessas LRRs desviam-se quando comparados a de outros típicos membros dessa família, de maneira que suas LRRs podem ser divididas em três regiões: N-terminal, central e C-terminal (Figura 4A). A região central do ECD do TLR4 (assim como no TLR1, TLR2, TLR6 e TLR10) não possui a típica rede de asparaginas cuja principal função é conferir estabilidade à estrutura em forma de ferradura (Figura 4B). Desta forma, essa quebra na rede de asparaginas tende a permitir distorções estruturais nestes receptores (Kang & Lee, 2011; Manavalan *et al.*, 2011).

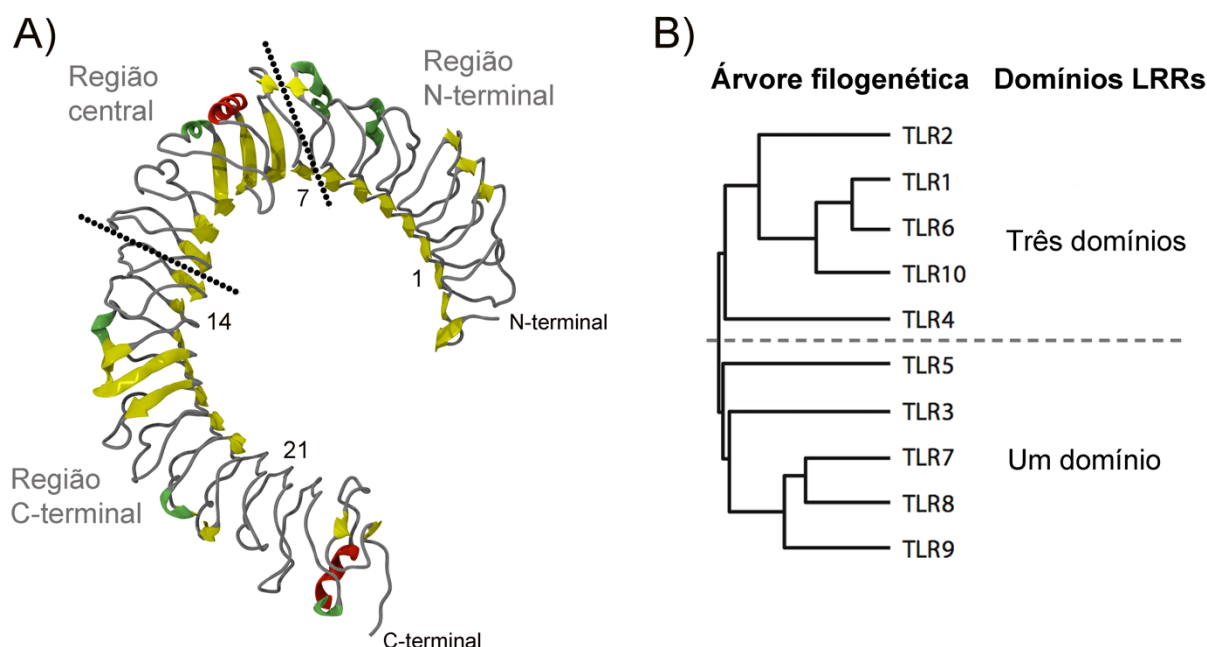


Figura 4. Estrutura do ECD de hTLR4. (A) O ECD solenóide do hTLR4 é mostrado em cartoon, em que as diferentes regiões de LRRs são destacadas, bem como numeradas na região interior da estrutura. O ECD é colorido por estrutura secundária, em que fitas β são mostradas em amarelo; α -hélices, em vermelho; hélices 3_{10} , em

verde; e alças, voltas e β -bridges em cinza. (B) A árvore filogenética dos TLRs, analisados quanto a estrutura dos domínios de LRRs, sugere a divisão dos mesmos em duas grandes subclasses (possuidores de três e de um domínio de LRRs).

Ainda, a região extracelular do hTLR4 apresenta-se altamente glicosilada, tendo nove sítios de N-glicosilação observados e adicionalmente, um sítio potencial: ASN35, ASN173, ASN205, ASN282, ASN309, ASN497, ASN526, ASN575, ASN624 e ASN630 (potencial) (UniProt ID: O00206). Apesar da grande quantidade de glicosilação encontrada neste receptor, pouca informação específica está disponível acerca da composição destas estruturas de glicosilação.

Neste ECD, a região côncava difere consideravelmente da região convexa, a qual é mais variável e pode estar associada à capacidade apresentada por esta família de receptores de reconhecer tantos diferentes tipos de ligantes. No hTLR4, essa região variável do ECD possui principalmente alças e voltas conectando as fitas da folha β central, apresentando também nestas conexões hélices e fitas (Park *et al.*, 2009) (Figura 4 e Tabela 5).

Tabela 5. Conteúdo de Estrutura Secundária no hTLR4. Na tabela, valores de quantidade de resíduos envolvidos em diferentes estruturas secundárias são mostrados para o cristal 3FXI, o qual contém dois monômeros do hTLR4 (cadeias A e B). As predições são feitas com base na análise do conteúdo de estrutura secundária pelos programas DSSP e STRIDE (Heinig & Frishman, 2004; Hess *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009).

	Estrutura Secundária	hTLR4 (cadeias)			
		A		B	
		DSSP	STRIDE	DSSP	STRIDE
N° de resíduos	Alças e voltas	342	415	344	415
	Folha β	109	129	109	132
	β -Bridge	15	9	16	7
	Bend	78	-	78	-
	α -Hélices	23	20	19	19
	Hélice 3-10	34	28	35	28

Ainda, o hTLR4 pode estar associado a uma proteína que é dita sua co-receptora, o MD-2, visto que a mesma têm papel auxiliar no processo de reconhecimento de LPS por este receptor (Park *et al.*, 2009).

1.3.1.1.1 MD-2

A proteína MD-2 (*myeloid differentiation factor-2*, ou ainda, *Ly96*) é uma proteína pequena (± 14 kDa) de 160 aminoácidos, que atua como co-receptor do hTLR4 no reconhecimento de LPS. Esta proteína apresenta um enovelamento do tipo β -cup, com duas folhas β antiparalelas formando uma cavidade hidrofóbica central responsável pelo ancoramento do LPS (UniProt ID: Q9Y6Y9; Kang & Lee, 2011) (Figura 5). Essa cavidade é interiormente preenchida por resíduos hidrofóbicos, enquanto sua região de abertura apresenta resíduos positivamente carregados (Figura 5B).

O formato geral da estrutura do MD-2, bem como a distribuição de cargas na cavidade parecem ser otimizados para a interação com moléculas anfipáticas, como o LPS. Esta endotoxina é fornecida ao MD-2 pela proteína CD14, também co-receptora, mas não diretamente associada ao hTLR4 (Kang & Lee, 2011).

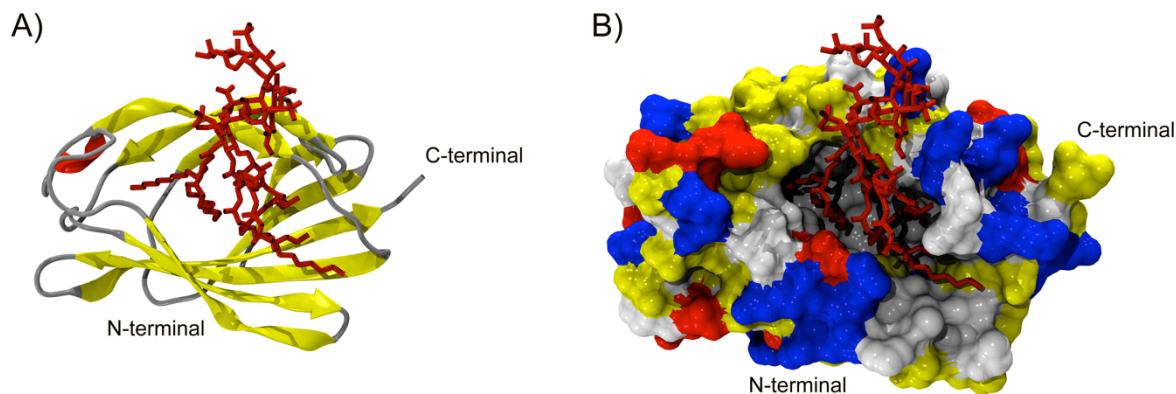


Figura 5. Estrutura do MD-2 ligado a LPS. Em (A) são representados em cartoon e em bastões coloridos em vermelho, o MD-2 e o LPS, respectivamente. A representação do MD-2 é colorida por estrutura secundária, em que folhas β são mostradas em amarelo; hélices, em vermelho; e voltas e alças, em cinza. Em (B) o MD-2 e o LPS são mostrados em superfície e bastões, respectivamente, mostrados na mesma posição que em (A). O LPS é colorido em vermelho, enquanto o MD-2 é colorido por grupos de resíduos de aminoácidos, em que, aminoácidos hidrofóbicos são mostrados em cinza; aminoácidos polares, em amarelo; aminoácidos negativos, em vermelho; e aminoácidos positivos em azul.

O MD-2 interage com a região côncava do hTLR4, se ligando ao mesmo, principalmente, por interações hidrofílicas (tais como ligações de hidrogênio e pontes salinas). Os contatos de MD-2 ao hTLR4 envolvem duas regiões quimicamente distintas, o domínio N-terminal (constituída por aminoácidos de carga predominantemente negativa) e o domínio central (composto por aminoácidos principalmente positivos) (Park *et al.*, 2009) (Figura 6).

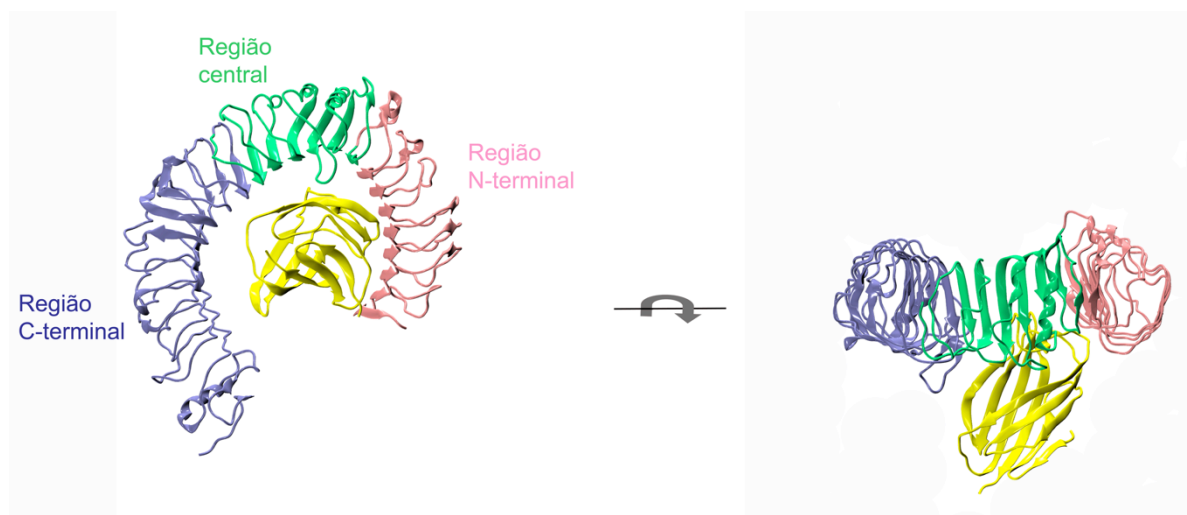


Figura 6. Interação entre hTLR4 e MD-2. A interface primária de interação entre hTLR4 e MD-2, anterior ao reconhecimento de ligante, é mostrada em vista lateral (esquerda) e de topo (direita). As estruturas dos monômeros de hTLR4 e MD-2 são mostradas em cartoon, em que o MD-2 é colorido em amarelo e o hTLR4 por regiões de LRRs (azul, verde e rosa), em que as LRRs N-terminal (em rosa) e central (em verde) interagem diretamente com MD-2 (Figura gerada a partir da estrutura 3FXI - Park *et al.*, 2009).

O MD-2, por si só, não é capaz de transmitir o sinal de infecção, uma vez que não é uma proteína transmembrana e tampouco possui um domínio intracelular. Assim, uma vez o LPS ligado ao poço de MD-2 há a direta dimerização do complexo hTLR4 - MD-2 - LPS para a transdução do sinal de infecção (Park *et al.*, 2009; Kang & Lee, 2011), formando um complexo heterotetramérico (portando dois heterodímeros hTLR4 - MD-2 associados ao ligante).

Na dimerização (formação do heterotetrâmero), as LRRs de 15 a 17 do hTLR4 formam ligações hidrofóbicas e hidrofílicas com as alças do segundo monômero de MD-2 que abrigam os resíduos F126 e L87 (Park *et al.*, 2009).

Estudos já mostraram que o MD-2 possui alta afinidade por LPS, estando diretamente envolvido nos processos de reconhecimento e ligação ao mesmo em

superfícies celulares (Shimazu *et al.*, 1999, Ohto *et al.*, 2007, DeMarco *et al.*, 2011). No entanto, para os demais ligantes caracterizados para o hTLR4, estudos tem mostrado que o MD-2 pode não ser essencial às funções do receptor, podendo estar ausente em alguns casos (Leal *et al.*, 2010, Figueiredo *et al.*, 2012, Leal *et al.*, 2012, Leal & Pearlman, 2012).

1.3.1.2 Domínio Transmembrana

Ligando a porção extracelular à intracelular do hTLR4 está uma sequência de 21 resíduos de aa predita em literatura como formadora de uma hélice que encaixa-se na membrana ancorando os domínios do receptor (UniProt ID: O00206). Pouca informação há disponível acerca da estrutura ou posicionamento desta hélice em membrana (Kang & Lee, 2011; Vanderbon *et al.*, 2012) (Figura 7).

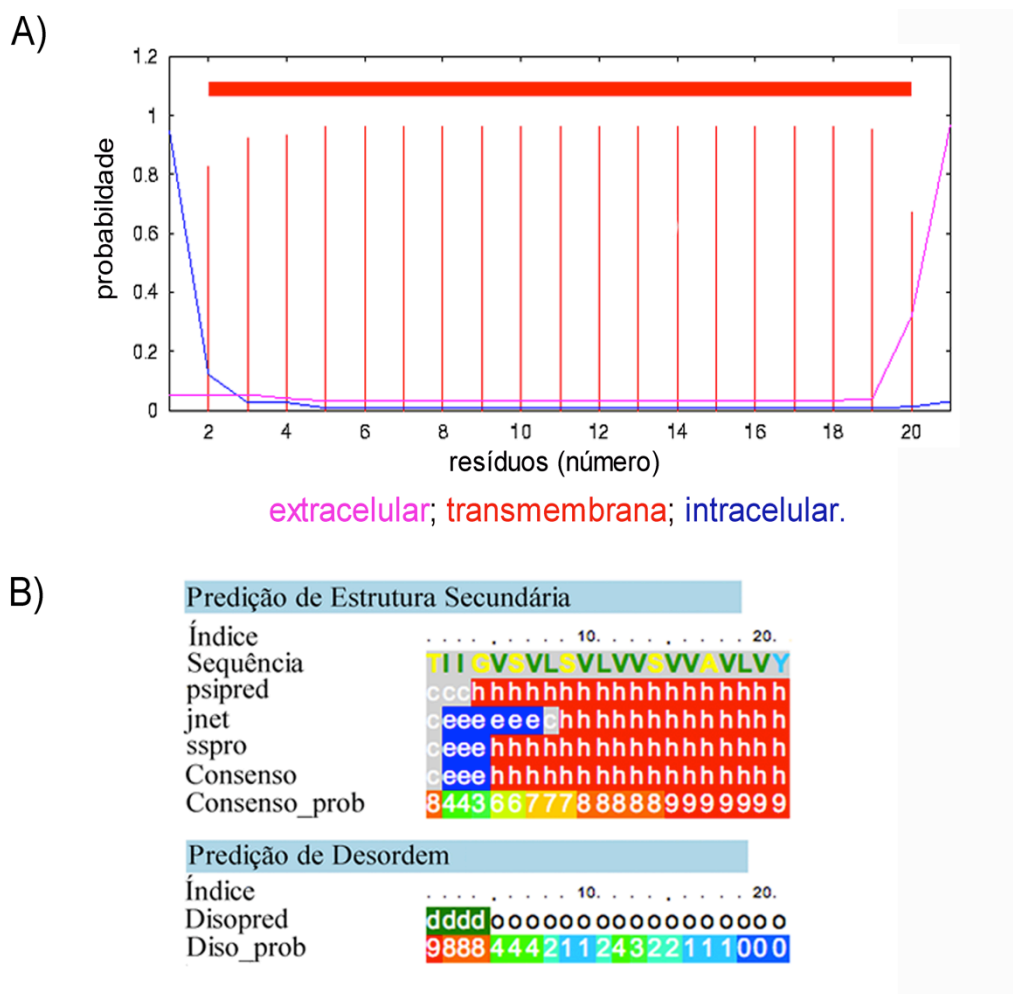


Figura 7. Região transmembrana de hTLR4. (A) Resultado de programa de predição de domínios para a sequência de 21 resíduos de aa do hTLR4, preditos como inseridos

em membrana (intervalo entre os resíduos 632 a 652), realizada com o servidor THMMM (Krogh *et al.*, 2001). (B) Conteúdo de estrutura secundária previsto para os 21 resíduos do hTLR4 preditos como transmembrana (intervalo entre os resíduos 632 a 652). O esquema mostra o arquivo de saída gerado pelo servidor PHYRE (Kelley & Stenberger, 2009), em que, de cima para baixo são mostrados (depois do índice e sequência da proteína) as predições feitas pelos programas psipred, jnet e sspro, bem como a predição consenso a partir das análises e um informativo acerca do grau de probabilidade de ocorrência desse consenso. No segundo grupo de resultados, são mostrados dados de desordem proteica gerados pelo programa Disopred, bem como a probabilidade de ocorrência da mesma (Diso_prob). Na figura, c representa conteúdo de alças; h, de hélices; e, de fitas; d, de região desordenada; e o, de região ordenada.

1.3.1.3 Domínio Intracelular

Encarregado da sinalização intracelular, o domínio intracelular do hTLR4 apresenta 187 aa (Uniprot ID: O00206) e, a despeito de não apresentar estrutura tridimensional resolvida experimentalmente, apresenta homologia aos demais domínios TIR desse família de receptores, os quais são arranjados de forma globular (Figura 8), sendo constituídos por hélices e fitas (Basith *et al.*, 2011; Manavalan *et al.*, 2011).

O domínio TIR, mediante o reconhecimento de ligantes pelo ECD e consequente dimerização, interage com proteínas adaptadoras intracelulares que também possuem um domínio do tipo TIR. No caso do hTLR4, a transdução do sinal pode levar ao recrutamento das quatro moléculas adaptadoras envolvidas no processo de sinalização: a MyD88, TRIFF, TIRAP (também dita Mal) e TRAM (Gangloff *et al.*, 2012). A transdução do sinal, por sua vez, através de diferentes vias (de acordo com as diferentes moléculas adaptadoras recrutadas) induz a expressão de uma série de genes envolvidos na resposta inflamatória, como quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, moléculas antimicrobianas, entre outras moléculas co-estimulatórias da resposta imune adaptativa (Moresco *et al.*, 2011).

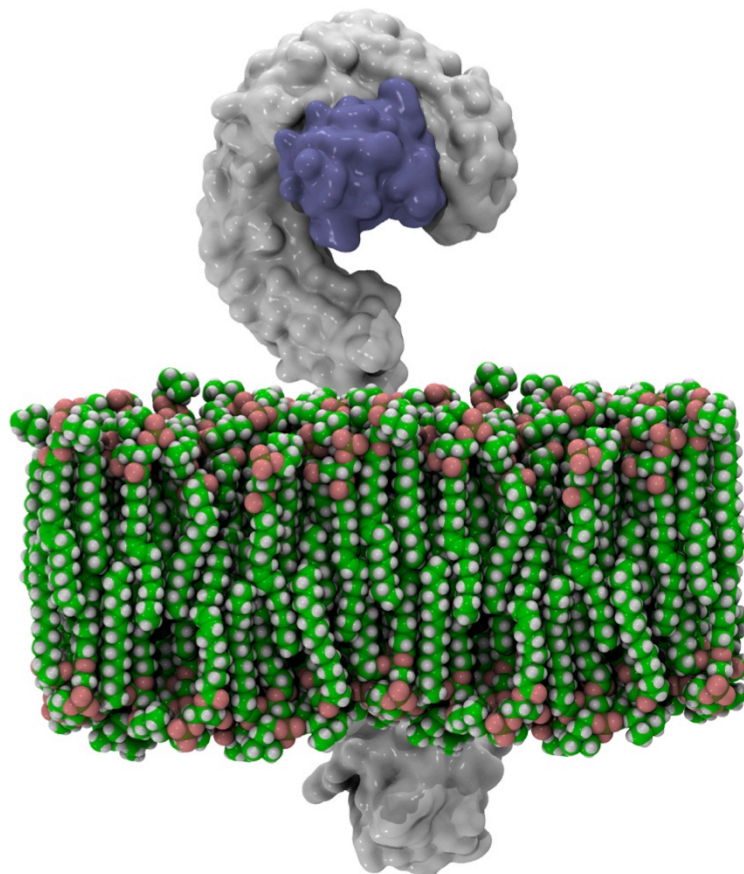


Figura 8. Representação esquemática do complexo hTLR4 - MD-2, responsável pelo reconhecimento de LPS em sistemas biológicos. Em superfície cinza está representado um modelo da estrutura inserida em membrana do hTLR4. Em superfície lilás é mostrado o co-receptor MD-2, associado ao ECD do hTLR4. A membrana é representada em esferas, com os átomos de carbono representados em verde, os átomos de hidrogênios em branco e os átomos de oxigênios em salmão. O complexo foi montado utilizando as estruturas de PDB ID 3FXI (portando o complexo do ECD de hTLR4 associado a MD-2) e a de PDB ID 2J67 (portando o domínio TIR do hTLR10).

1.4 A Dinâmica Molecular na caracterização conformacional de biomoléculas

A Dinâmica Molecular (DM) é um método de simulação computacional que permite a representação de interações moleculares, ao longo de determinado período de tempo, através da representação do movimento dos átomos de um determinado sistema (McCammon *et al.*, 1977). Trabalhos utilizando esta técnica para o estudo de fenômenos biológicos têm sido amplamente empregados, sendo o primeiro registro de utilização desta abordagem em biomoléculas datado nos

anos 70, com o estudo do inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI) (McCammon *et al.*, 1977).

As simulações de DM são baseadas na mecânica clássica e na integração da equação de movimento de Newton para cada átomo i do sistema molecular, em que:

$$F_i = m_i \times d^2 r_i(t) / dt^2$$

The diagram illustrates the equation $F_i = m_i \times d^2 r_i(t) / dt^2$. Below the equation, three colored boxes are connected to the terms: a red box labeled 'Força de um átomo i' is connected to F_i ; a blue box labeled 'Massa de um átomo i' is connected to m_i ; and a yellow box labeled 'Aceleração de um átomo i' is connected to $d^2 r_i(t) / dt^2$.

A integração das equações de movimento, quando realizada sucessivamente e sobre todos os átomos de determinado sistema, representa a evolução, ao longo do tempo, das diferentes posições destes átomos, gerando informações de movimentos moleculares. A esse conjunto de dados é dado o nome trajetória, por meio da qual pode-se analisar uma série de propriedades dependentes do tempo para determinado sistema em estudo, tais como difusão, envelhecimento, distribuições das moléculas de solvente em torno de um soluto, entre outras (Leach, 2001; de Sant'Ana, 2009).

A integração é realizada de forma que uma força F_i acarreta uma aceleração sobre um determinado átomo i e, em consequência, causa uma mudança de sua posição num intervalo de tempo Δt relativo à aceleração. No entanto, considerando somente a equação acima mostrada, não é possível determinar o módulo e a direção da força F_i sobre os átomos do sistema, nem sua relação com as características químicas de cada molécula em estudo. Assim, tais parâmetros são calculados em função de mudanças na energia potencial/cinética entre a posição atual e a posição seguinte (a que representará o próximo passo da simulação) sobre cada átomo separadamente. Esta superfície de energia potencial representa a energia de cada molécula, sendo descrita pelo denominado campo de força (Schlick, 2006).

O campo de força pode ser descrito como um conjunto de funções (Figura 9) e parametrizações usadas em cálculos de mecânica molecular (de Sant'Anna, 2002; Oostenbrink *et al.*, 2004). Estas funções definem as energias de estiramento de ligação e de distorção de ângulo de ligação (tanto de valência quanto de diedro)

de uma molécula quando comparadas com a sua conformação não tensionada (aquela caracterizada pelos valores-padrão de comprimentos e de ângulos de ligação) (Leach, 2001; Schlick, 2006).

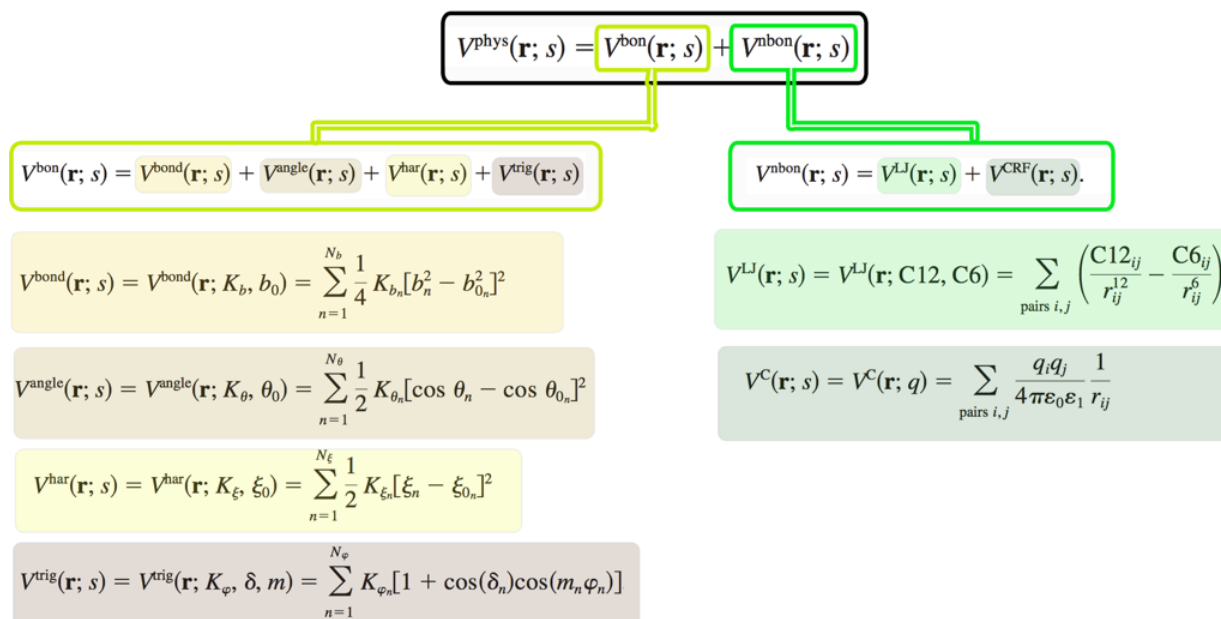


Figura 9. Funções de energia que compõem o campo de força GROMOS. As funções de energia de interação física (V^{phys}), dividem-se em dois tipos de interação: ligadas (V^{bon}) e não ligadas (V^{nbond}). As V^{bon} representam a soma dos termos que descrevem o estiramento das ligações químicas (V^{bond}), de ângulos de ligação (V^{angle}) e diedros próprios (V^{trig}) e impróprios (V^{har}). As V^{nbond} , por sua vez, são dadas pela união dos termos de interação de van der Waals (V^{LJ}) e interações eletrostáticas (V^{C}) entre todos os pares de átomos. Nas equações, \mathbf{r} representa a coordenada do átomo e \mathbf{s} as funções do campo de força. Figura adaptada a partir de Oostenbrink *et al.*, 2004.

Nesse contexto, os campos de força, juntamente com possíveis termos adicionais (por exemplo, de interação entre átomos não ligados, de efeitos eletrostáticos, de ligação de hidrogênio e de outros efeitos estruturais), expressam o somatório das funções de energia potencial de cada átomo e calculam a energia dos sistemas em função das posições dos núcleos dos átomos, representados por esferas unidas por molas (Leach, 2001; Schlick, 2006).

Diversos campos de força estão disponíveis para os cálculos por simulações de DM, como AMBER (Case *et al.*, 2005), CHARMM (MacKerell *et al.*, 1998), CVFF (Kitson & Hagler, 1988), TRIPOS (Clark *et al.*, 1989), OPLS (Jorgensen & Tirado-Rives, 1988) e GROMOS96 (van Gunsteren *et al.*, 1996). Dentre estes, destacam-

se aqueles disponíveis em domínios públicos (de Sant'Anna, 2009), como, por exemplo, o pacote de programas GROMACS (Hess *et al.*, 2008).

1.4.1 Análisisando os dados de simulações de DM

Na etapa de processamento dos dados obtidos por meio das simulações de DM, uma série de análises podem ser aplicadas ao sistema em estudo, sendo esse discernimento (do tipo de análise a aplicar), um ponto determinante não só na apresentação dos resultados, como também na geração das demais informações que se pretende extrair do sistema em estudo.

Algumas análises são amplamente empregadas devido a sua capacidade de fornecer informações importantes para o delineamento das demais análises a serem realizadas.

1.4.1.1 Desvio médio quadrático (Root Mean Square Deviation - RMSD)

A análise para comparação entre estruturas de proteínas mais frequentemente utilizada na biologia estrutural é aquela pelo valor do RMSD, obtida após uma sobreposição roto-translacional (Kuzmanic & Zagrovic, 2009). Assim, esta análise permite-nos verificar se existem diferenças entre duas estruturas estáticas. De modo que,

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i^X - r_i^Y)^2},$$

em que N é o número de átomos, i é o átomo em análise, r^X é a estrutura alvo, e r^Y é a estrutura avaliada como referência para a análise da estrutura alvo (Knaap *et al.*, 2009).

Desta forma, em uma trajetória obtida por DM, é possível verificar o quanto a estrutura da molécula de estudo variou ao longo do tempo em comparação a uma estrutura referência (por exemplo, sua estrutura cristalográfica) (Figura 10).

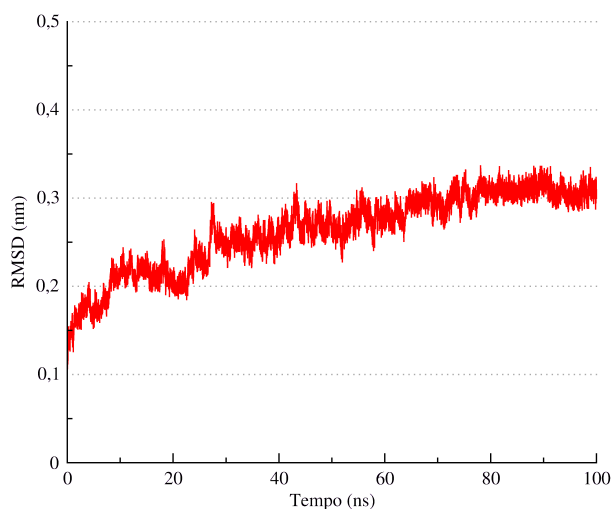


Figura 10. Exemplo de dado gerado por análise de RMSD. No eixo Y é mostrada a alteração estrutural da molécula (comumente fornecida em nanômetros ou angstroms), quando em comparação com uma estrutura de referência (usualmente o cristal), ao longo do tempo (eixo X; geralmente avaliado na escala de picossegundos -ps- ou nanossegundos -ns).

A aplicação da análise é diversa e inclui o monitoramento de mudanças estruturais em simulações de enovelamento e dinâmica proteica, avaliando a qualidade de esquemas de predição de estrutura, comparando diversidade de modelos estruturais derivados de experimentos, acessando as propriedades de abordagem em diferentes níveis de resolução, e definindo formas de alta resolução de polímeros. Ademais, em uma simulação computacional, a diversidade estrutural de uma amostragem de estruturas biomoleculares pode ser analisada frequentemente por cálculo do RMSD de todas as distribuições contra todas as distribuições. Cálculo este, inclusive, utilizado comumente em espectroscopia por RMN para acessar as similaridades entre as estruturas geradas (Kuzmanic & Zagrovic, 2009).

1.4.1.2 Raio de Giro (Radius of Gyration - Rg)

O raio de giro de uma proteína é definido como a distância média quadrática de cada átomo da proteína em relação ao seu centróide. Em que

$$R_g = \left(\frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^{\frac{1}{2}}$$

sendo m_i a massa do átomo i e r_i a posição do átomo i em relação ao centro de massa da molécula (Hess *et al.*, 2008).

Assim, essa análise fornece informação acerca do nível de compactação da estrutura de determinada molécula (por exemplo, quão enovelada ou não uma cadeia polipeptídica está). Sendo essa informação especialmente útil na caracterização de polímeros em solução e proteínas (Hess *et al.*, 2008).

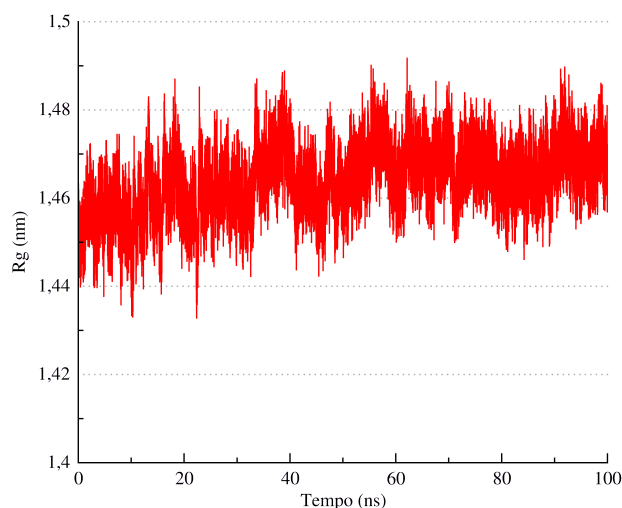


Figura 11. Exemplo de dado gerado por análise de Raio de giro. No eixo Y é mostrado o grau de compactação ou expansão da molécula (em nanômetros) em função do tempo, quando em comparação com uma estrutura de referência (geralmente o cristal).

Usualmente essa análise é empregada não só para descrever a compactação de uma proteína como também no estudo de seu processo de enovelamento a partir de um estado de desnaturação protéica para seu estado nativo (Lei & Liu, 2008). No estudo do enovelamento protéico, o Rg é uma importante quantificação devido a sua significância física direta e sua facilidade de medição experimental (Lei & Liu, 2008).

1.4.1.3 Flutuação média quadrática (Root Mean Square Fluctuation - RMSF)

O RMSF é uma medida de flexibilidade em função do tempo. De modo que,

$$\text{RMSF}_i = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{k=1}^M (r_i(t_k) - \tilde{r}_i)^2},$$

em que, M é o número de frames (fotografias, passos que compoem a trajetória) a ser analisado, $r_i(t_k)$ é a partícula i do complexo r no tempo k , e \tilde{r} é a referência. Esta referência pode ser a média em uma determinada janela de tempo (Knaap *et al.*, 2009). Assim, um gráfico de RMSF indica a flexibilidade de uma molécula dada pela flutuação de seus resíduo ou átomos (por exemplo) ao longo do tempo (Figura 12).

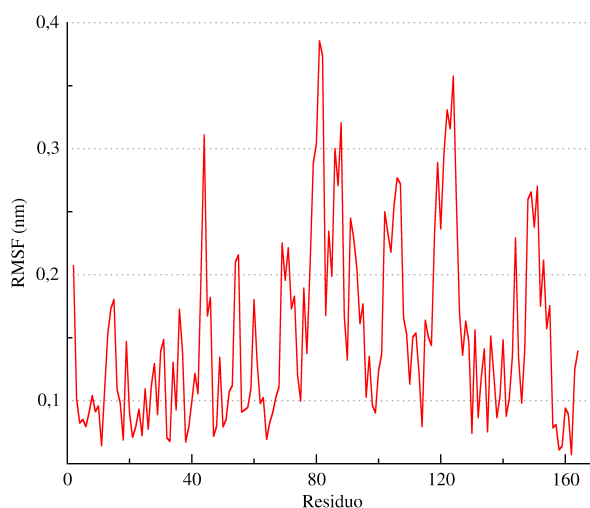


Figura 12. Exemplo de dado gerado por análise de RMSF. No eixo Y é mostrada a flutuação de cada resíduo (identificado em X) em relação a posição dos mesmos em uma estrutura referência (por exemplo, a estrutura cristalográfica).

2 Objetivos

Objetivo Geral

Caracterizar estruturalmente o hTLR4 e investigar o papel da oligomerização do mesmo na sua biologia estrutural.

Objetivos Específicos

- Descrever a dinâmica da forma monomérica do hTLR4 em ambiente fisiológico.
- Avaliar, a nível estrutural, a influência da formação do complexo hTLR4 - MD-2, para ambas as proteínas envolvidas.
- Investigar a importância da formação de homodímeros do hTLR4 para a dinâmica desta proteína.
- Investigar o papel da associação da hetero- e homo oligomerização do hTLR4 para sua estrutura e conformação.

3 Metodologia

3.1 Programas utilizados

O presente estudo envolveu a utilização da técnica de DM, através do pacote GROMACS v.4.5 (Hess *et al.*, 2008), cujo protocolo é descrito em detalhes na seção 3.3, a seguir.

As análises dos sistemas foram realizadas valendo-se também do pacote de programas GROMACS, com a adicional utilização dos programas PDBSUM (Laskowski *et al.*, 2009), Stride (Frisman *et al.*, 1995) e ferramentas de análise do VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

O programa VMD também foi empregado para fins de visualização de moléculas (Humphrey *et al.*, 1996).

3.2 Construção dos sistemas

Os sistemas-alvo simulados por DM foram gerados a partir da estrutura tridimensional do complexo hTLR4 - MD-2 - LPS, depositada no PDB sob código de identificação 3FXI (Park *et al.*, 2009). Este cristal possui 3,1 Å de resolução e apresenta a porção do ECD do complexo de reconhecimento de LPS em humanos. Nesta estrutura estão presente duas cópias do complexo hTLR4 - MD-2 - LPS, arranjados³ de maneira simétrica (Figura 13).

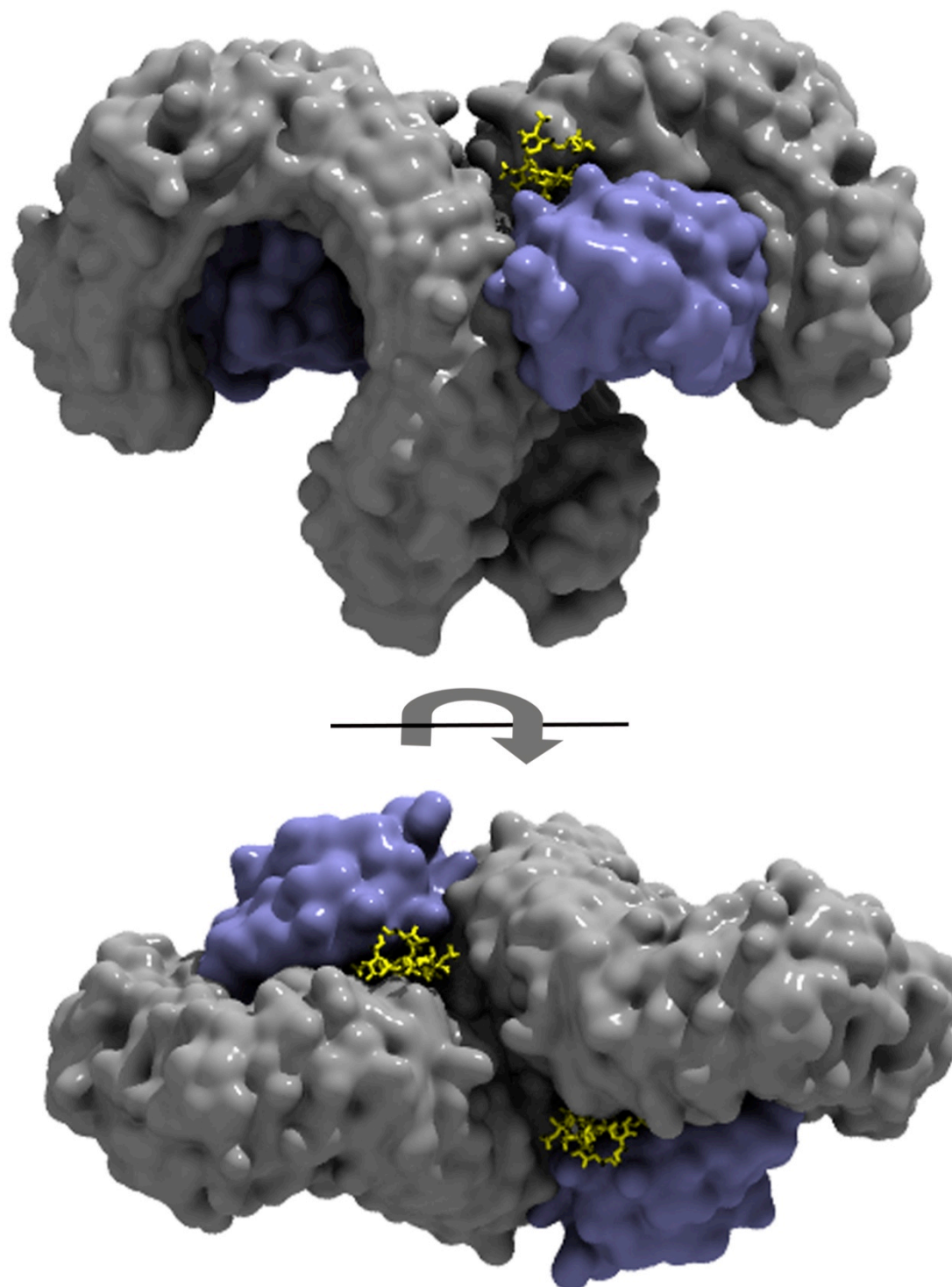


Figura 13. Estrutura cristalográfica do complexo hTLR4 - MD-2 - LPS. Representação em superfície da estrutura cristalográfica do complexo de reconhecimento de LPS (PDB ID 3FXI) em vista lateral (acima) e de topo (abaixo). O sistema porta duas cópias do complexo hTLR4 - MD-2 - LPS, arranjadas de maneira simétrica. Em cinza estão representados os dois monômeros do hTLR4; em lilás, os monômeros do co-receptor MD-2; e, em amarelo, representado em bastões, o ligante LPS.

Deste modo, a estrutura 3FXI apresenta dois monômeros do hTLR4 (cadeias A e B), dois monômeros do co-receptor MD-2 (também denominados de cadeias A e B) ligadas ao hTLR4 e, dois fragmentos de LPS ligados ao MD-2. Os monômeros das cadeias A e B tanto do hTLR4, quanto do MD-2, apresentam igual sequência de aminoácidos e muito semelhante enovelamento (Tabela 4 e Figura 14).

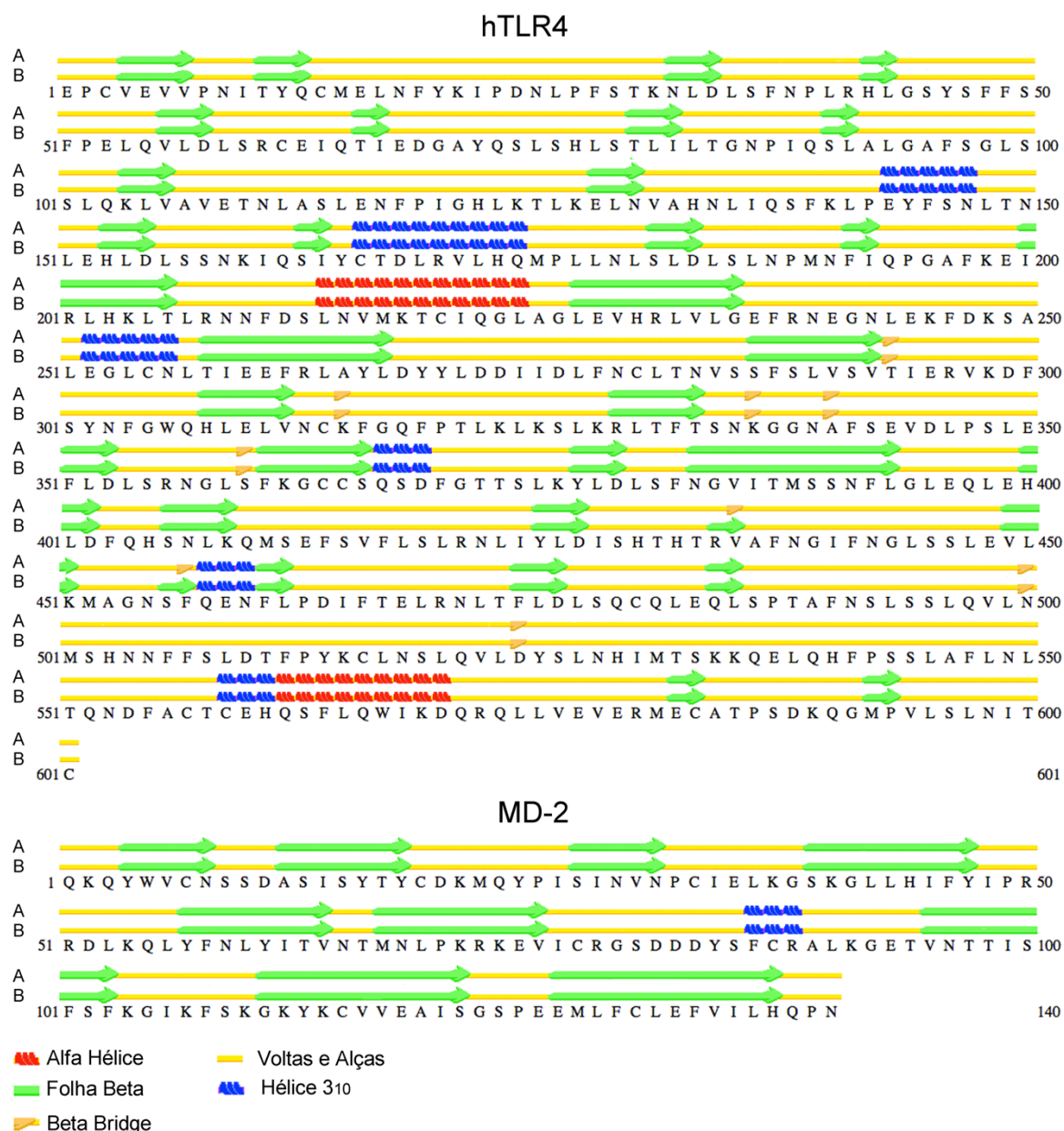


Figura 14. Sequência e estrutura das proteínas constituintes do cristal 3FXI (hTLR4 e MD-2). Determinação do conteúdo de estrutura secundária dos monômeros A e B das proteínas hTLR4 e MD-2, presentes na estrutura cristalográfica 3FXI, pelo programa Stride (Frisman *et al.*, 1995). A legenda da figura segue na porção inferior da mesma e, os número ao início e final das linhas indicam a respectiva numeração do

primeiro e último aminoácido presente na referida linha; as letras A e B indicam a cadeia dos monômeros.

Assim, a partir da estrutura cristalográfica 3FXI os seguintes sistemas foram preparados (Figura 15):

- **(hTLR4 - MD-2)₁**: heterodímero, portando uma cópia do complexo hTLR4 - MD-2, (cadeias A cristalográfica);
- **hTLR4**: monômero de hTLR4, portando apenas o monômero do receptor (cadeia A);
- **(hTLR4 - MD-2)₂**: heterotetrâmero, portando duas cópias do complexo (hTLR4 - MD-2)₁, ou seja, as cadeias A e B cristalográficas;
- **(hTLR4)₂**: homodímero de hTLR4, portando as duas cópias do receptor (cadeias A e B).
- **(MD-2)₁**: monômero do MD-2, portando um monômero do co-receptor, (cadeia A).

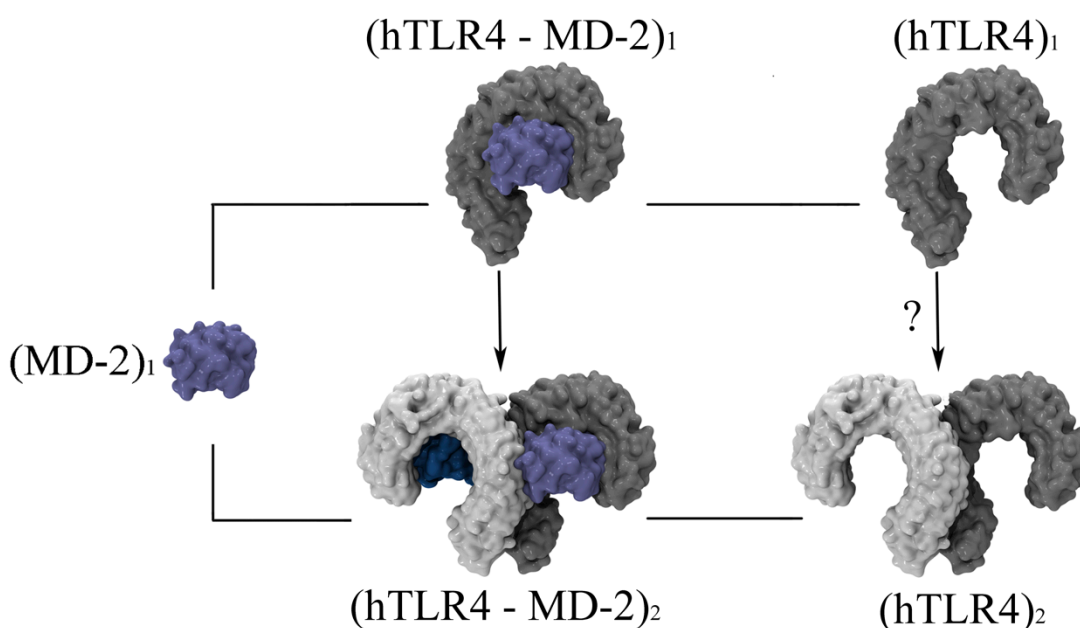


Figura 15. Sistemas simulados. Representação esquemática dos cinco sistemas estudados. As proteínas estão representadas como superfícies, estando os monômeros da cadeia A do receptor e co-receptor, mostrados em cinza e lilás, respectivamente. Os monômeros da cadeia B do receptor e co-receptor são representados em branco e azul, respectivamente. As linhas indicam as relações entre

os sistemas, as setas indicam os processos de formação de dímeros de hTLR4, em que a forma do sistema (hTLR4)₂ é apresentada como incerta (?), uma vez que ainda não há uma descrição precisa da mesma.

3.3 Simulações de DM

O protocolo geral de simulação foi baseado em procedimentos previamente descritos (de Groot & Grubmüller, 2001).

Foram realizadas simulações em duplicatas para cada sistema anteriormente citado, a fim de garantir a reprodutibilidade dos dados. O mesmo protocolo foi utilizado para cada uma das simulações, conforme descrito a seguir.

Todos os cálculos foram realizados usando o pacote de simulação GROMACS (Hess *et al.*, 2008) e o campo de força GROMOS53a6 (Oostenbrink *et al.*, 2004). Cada sistema foi solvatado em uma caixa retangular (exceto pelo sistema (hTLR4 - MD-2)₂, o qual foi solvatado em caixa dodecaédrica, devido sua extensa distribuição) utilizando condições periódicas de contorno, empregando o modelo de água SPC (Berendsen *et al.*, 1981). Contra-íons (cloreto ou sódio) foram adicionados, conforme a necessidade, de forma a neutralizar as cargas dos sistemas estudados. O método Lincs (Hess *et al.*, 1997) foi aplicado na restrição de ligações covalentes, bem como houve a utilização do método sítios virtuais (*dummy atoms*) (Feenstra *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 2008) a fim de eliminar movimentações muito rápidas de átomos de hidrogênio, permitindo um passo de integração de 4 fs. As interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método Particle-Mesh Ewald (PME) (Darden *et al.*, 1993) com raios de corte de *Coulomb* e de van der Waals de pelo menos 10 Å. A temperatura e a pressão do sistema foram mantidas constantes através do acoplamento do soluto, íons e solvente a banhos externos de temperatura e pressão, utilizando constantes de acoplamento de, respectivamente, $\tau = 0,1$ ps e $\tau = 0,5$ ps (Berendsen *et al.*, 1984). A constante dielétrica do meio foi tratada como $\epsilon = 1$. Exemplos de arquivos com parâmetros empregados nas simulações encontram-se no Apêndice A.

A temperatura de referência de todos os sistemas foi ajustada para 310 K após uma etapa de termalização, em que é feito um aquecimento gradativo de 50 a 300 K. Esta etapa inicia-se por um período de restrição de posição de 1ps a 50K, seguido por passos de 5 ps em que há o aumento gradual da temperatura em 50 K

(Figura 16). As simulações por dinâmica molecular geralmente iniciam com uma etapa de equilíbrio, a fim de uniformizar as energias contidas na estrutura de estudo (neste caso, cristalográfica) para que sejam evitadas deformações nessas moléculas.

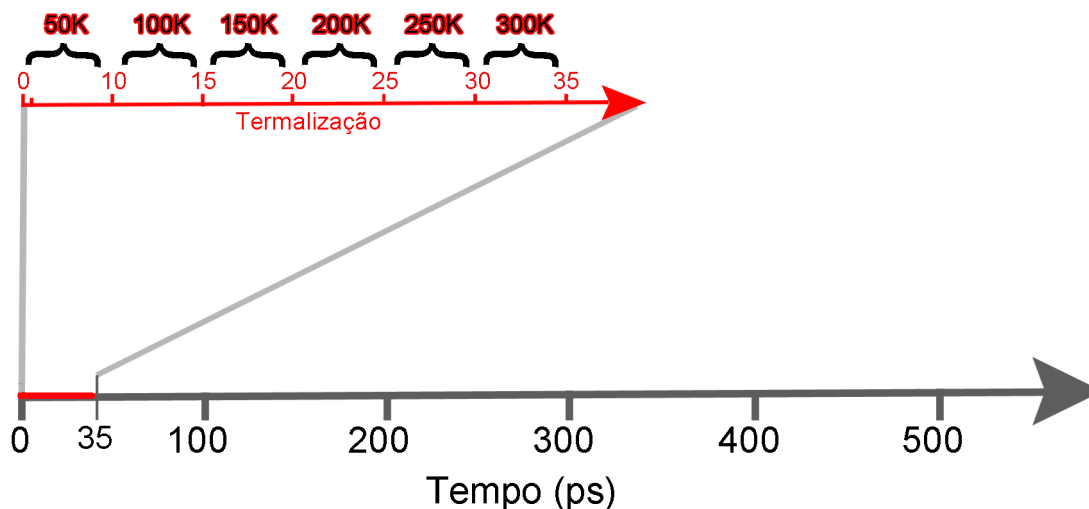


Figura 16. Esquema das etapas que compõem as simulações de DM a 310 K. De 0ps a 35ps, uma série de etapas aquece lentamente o sistema em incrementos de 50K. Após 35 ps, o sistema está a 300 K, temperatura na qual inicia-se a simulação, que terá 310 K como temperatura referência a ser mantida pelo resto da simulação (Adaptado de Verli, 2005).

3.4 Validação das simulações de DM

A confiabilidade das previsões baseadas em cálculos de DM depende, principalmente, da precisão do campo de força utilizado e do tamanho da amostragem do espaço conformacional realizada durante a simulação, que necessita ser suficientemente ampla para descrever as propriedades do sistema (van Gunsteren & Mark, 1998).

De modo geral, os resultados obtidos nas simulações de DM foram validados por comparação a dados experimentais prévios, como informações cristalográficas (tais como valores de B-factor) e dados bioquímicos e de modelagem computacional. Além disso, a manutenção de certas propriedades, como o conteúdo de estrutura secundária, foi constantemente avaliada como indicativo do estado das proteínas estudadas.

4 Resultados

4.1 Preâmbulo

Os resultados obtidos durante a realização da presente dissertação serão apresentados sob a forma de um trabalho a ser submetido à publicação. A seguir, será apresentado o resumo e a íntegra do referido manuscrito, seguindo os padrões² do periódico "*Biochemistry*", possível veículo de divulgação deste trabalho. Conforme recomendação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, as figuras foram inseridas ao longo do texto do manuscrito.

² Disponível em: <http://pubs.acs.org/page/bichaw/submission/authors.html>

Dynamics on human Toll-Like Receptor 4 complexation to MD-2

C. Carvalho de Aguiar^{1‡}

*H. Verli^{1**}*

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves
9500, CP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55-51-3316-7770; fax: +55-51-3316-7309; e-mail address:

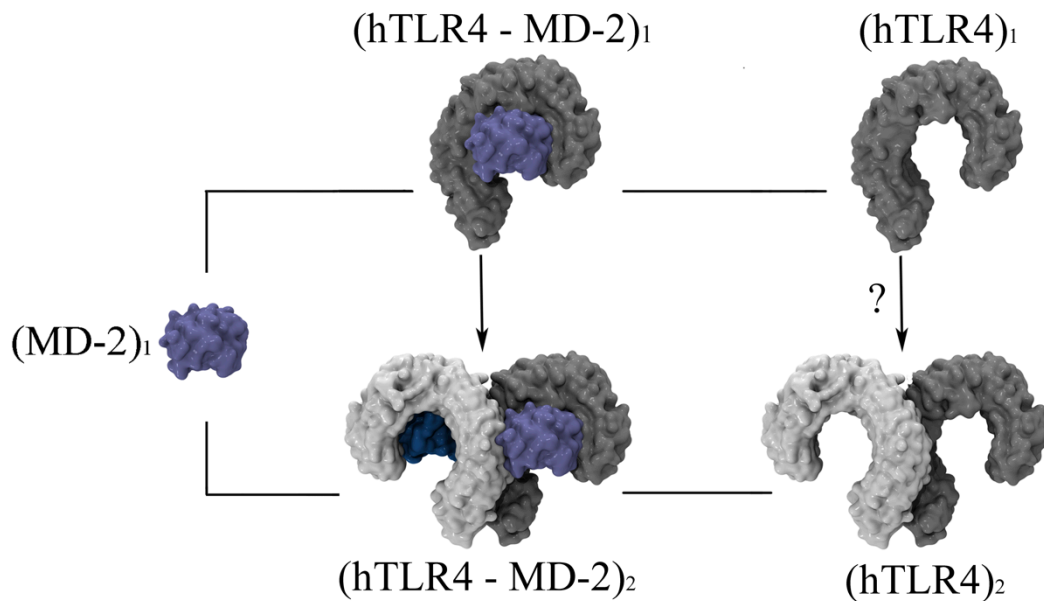
hverli@cbiot.ufrgs.br.

KEYWORDS: TLRs, innate immunity, molecular dynamics, structural biology.

ABBREVIATIONS

TLR: Toll-Like Receptor, LRRs: Leucine Rich Repeats, MD-2: Myeloid Differentiation
factor 2, MD: Molecular Dynamics, PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns,
DAMPs: Damage-Associated Molecular Patterns, TIR: Toll/Interleukin-1 Receptor, ECD:
extracellular domain, HSP: Heat Shock Proteins, PDB: Protein Data Bank, SPC: Simple Point
Charge, ps: picosecond, ns: nanosecond, fs: femtosecond, K: Kelvin, NMA: Normal Modes
Analysis, RMSF: Root Mean Square Fluctuation, RMSD: Root Mean Square Deviation

ABSTRACT



Human Toll-Like Receptor 4 (hTLR4) and its co-receptor, myeloid differentiation factor 2 (MD-2), as a heterodimer, is a well-known complex of Gram-negative bacteria lipopolysaccharide (LPS) recognition. In this process, MD-2 recognizes LPS and promotes the dimerization of the complex hTLR4 - MD-2 - LPS, initiating an intracellular immune signaling. Moreover, it has been reported that hTLR4 can also act in the absence of MD-2, in the case of other ligands recognition, and, in these cases, little is known about the structural and conformational changes that hTLR4 underwent. In the current study, employing molecular dynamics simulations, we had explored the dynamical properties of the hTLR4 - MD-2 complex and investigated the implications of the co-receptor complexation to the structural biology of hTR4. We observed that the receptor showed a tweezers-like movement, leading to a more opened final state of its horseshoe-shaped structure. Additionally, the stability of this structure seems to be influenced by the presence of the co-receptor, MD-2.

Toll-like receptors (TLRs) play an important role in innate immunity, recognizing broadly conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). TLR family consists of type I transmembrane proteins that detect PAMPs by its extracellular domain (ECD) and induces either homo- or hetero- dimerization. The oligomerization allows the signal transduction of infection via its intracellular TIR (Toll/interleukin-1 receptor) domain, linked to the ECD by a transmembrane helix [1].

Human TLR 4 (hTLR4) is mostly described as a receptor for the recognition of lipopolysaccharide (LPS), a major constituent of the cell wall in gram-negative bacteria [2, 3]. In these cases, hTLR4 depends on the MD-2, a small extracellular protein, which associates with hTLR4-ECD, acting as a co-receptor of the hTLR4. The hTLR4 - MD-2 complex recognizes LPS and induces dimerization of this complex for a proper signal transduction, resulting in the (hTLR4 - MD-2)₂ tetramer [3]. However, hTLR4 has also been reported in the recognition of other molecules, including endogenously derived DAMPs (damage-associated molecular patterns), such as HSPs [2], heparan sulphate and hyaluronic acid [3, 4, 5] and also other PAMPs, like fungal cell wall compounds [4, 6, 7] (see Table S1). In these cases, little is known about the structural features of the complex involved and also the way oligomerization of hTLR4 occurs.

The structure of hTLR4-ECD (or just hTLR4) adopts a solenoid horseshoe shaped structure, made up by leucine-rich repeats (LRRs) [8], involved in ligand recognition. These LRR motifs form a hydrophobic core, composed by leucine residues sometimes substituted by other hydrophobic amino acid residues such as valine, isoleucine, and phenylalanine. There are conserved asparagine residues that are important in maintaining the overall shape of the protein, since they form a continuous hydrogen-bond network with backbone carbonyl oxygens of neighboring LRRs modules [1]. On the other hand MD-2, a prototype molecule that defined a family of related proteins, presents a typical β -cup fold, constituted by two

antiparallel β -sheets. One sheet is composed by three antiparallel β strands and the other by six strands, forming a large hydrophobic cavity, where LPS is defined to interact with MD-2 [9, 10, 11].

MD-2 alone has been shown to interact with LPS [9], while the same behavior was sometimes seen for hTLR4, besides its low interaction with LPS alone [9, 12]. Moreover, the ability of hTLR4 to recognize other ligands than LPS, such as fungal polysaccharides, in the absence of MD-2 was already been seen, wherein the structural bases for the recognition are still unknown [7, 13].

In this context, the present study investigate the dynamical properties of hTLR4, searching for structural insights into hTLR4 - MD-2 cell surface complex, responsible for LPS recognition, aiming to contribute with novel data regarding this interaction and also features with respect to hTLR4 structural biology.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Systems. In order to evaluate the dynamics on MD-2 complexation to hTLR4, five systems were simulated based on the protein structure of human TLR4 - MD-2 - LPS complex, obtained from the PDB under ID 3FXI [14]. This structure contains the receptor composed by two copies of the hTLR4 - MD-2 - LPS complex, arranged in a symmetrical fashion [14]. hTLR4 (chains A and B), and MD-2 (chains A and B) were correspondingly complexed by its chains. The five following systems were delineated and submitted to molecular dynamics (MD): (1) the heterodimer, (hTLR4-MD-2)₁; (2) the hTLR4 monomer, (hTLR4)₁; (3) the heterotetramer, (hTLR4 - MD-2)₂; (4) the homodimer, (hTLR4)₂, and (5) the MD-2 monomer, (MD-2)₁ (Figure 1).

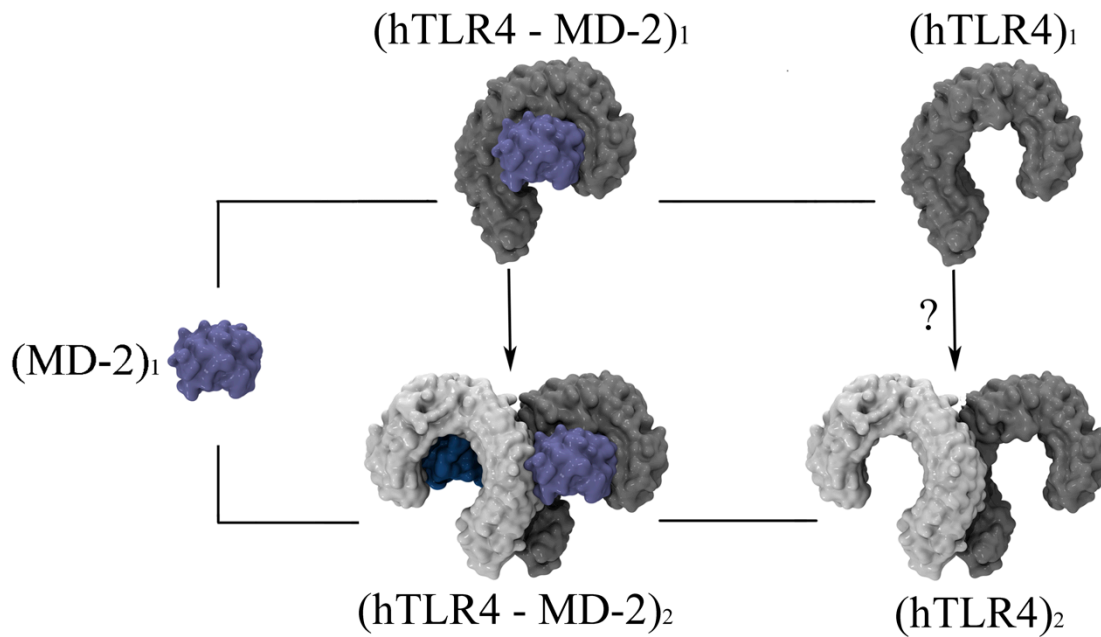


Figure 1. Representation of the simulated systems. The proteins are shown in molecular surface, in which chain A of hTLR4 and MD-2 is shown in dark gray and violet, respectively. The chain B of hTLR4 and MD-2 is represented in white and dark blue, respectively. The lines indicate the relation between systems and their control systems and, arrows indicate the dimerization process, in which (hTLR4)₂ dimerization has not been demonstrated.

Molecular Dynamics Simulations. GROMACS simulations suite [15] and GROMOS53a6 force field [16] were used, employing an MD protocol based on previous studies [17]. Briefly, all systems were solvated with Simple Point Charge (SPC) water model [18] in rectangular boxes [except for the system (hTLR4 - MD-2)₂, that was solvated in an octahedron box- due to its shape and size] by a layer of at least 10 Å from the solute atoms. Counter ions (Na⁺ or Cl⁻) were added to neutralize the system charges. The Lincs method [19] was applied to constrain covalent bond lengths and virtual sites [15, 20] were employed to eliminate fast motions of hydrogen atoms, enabling an integration step of 4 fs. Energy minimization was performed using steepest descents algorithm under periodic boundary conditions, followed by the thermalization phase, where the systems were heated slowly from 10 to 300 Kelvin (K), in

steps of 5 ps, in which the reference temperature was increased by 50 K. After heating phase, all the systems were kept at a temperature of 310 K for the rest of the simulation. Temperature and pressure were kept constant by coupling protein, solvent and ions to external temperature and pressure baths with coupling constants of $\tau = 0.1$ and $t = 0.5$ ps [21], respectively. No restraints were applied after the thermalization phase. The electrostatic interactions were calculated with Particle Mesh Ewald method [22]. All systems were performed in duplicates, which were maintained under the same conditions in both experiment, in order of assurance and reproducibility of the data.

Analysis of simulated and structural data. The simulation analysis data were generated mainly using GROMACS suite v 4.5.1 [15], including the essential dynamics analysis performed.

For the B-factor analysis we did a screening on crystallographical B-factor data available for different crystal structures of TLRs. From these data, we performed multiple sequence alignment [23] and, once matched the correspondent residues, we calculate the averages and standard deviations for each residue of hTLR4. These data were further plotted on a graph of the B-factor pattern in TLR family.

The structural analyses were performed with additional application of Stride [24] and PDBSUM [25]. Furthermore, VMD [26] was used to perform the dynamical network analyses and to construct some figures. Moreover, the normal mode analysis (NMA) was made using the WebNMA server [27].

The analyses were performed along the entire MD trajectories for all chains present in the different complexes and equally to replicates. When the system presented similar results for both chains of the same protein, it was shown only as the chain A.

RESULTS

Horseshoe-like domain dynamics. In the molecular dynamics simulations of the hTLR4, the receptor showed pronounced alteration of their structure and conformation in comparison with the crystal structure, although no protein denaturation occurred (Figure 2A and Figure S1). Such distortions (Figure 2C) are mainly caused by the terminal residues of hTLR4 (the first 150 and the last 100 residues) (Figure 2B and Figure S2), indicating an expansion of the receptor curvature during simulations in comparison with the crystal structure. In this process, the presence of MD-2 could have contributed for the presented shortest values of residue fluctuation in both termini of (hTLR4 - MD-2)₂ (Figure 3 and Figure S2).

Such expansion of hTLR4 seems to behave as a tweezers-like movement in which the N- C- regions oscillate in a progressive opening (Figure 2D). This trend was observed in all simulations although when MD-2 was present, the values were lower (Table S2).

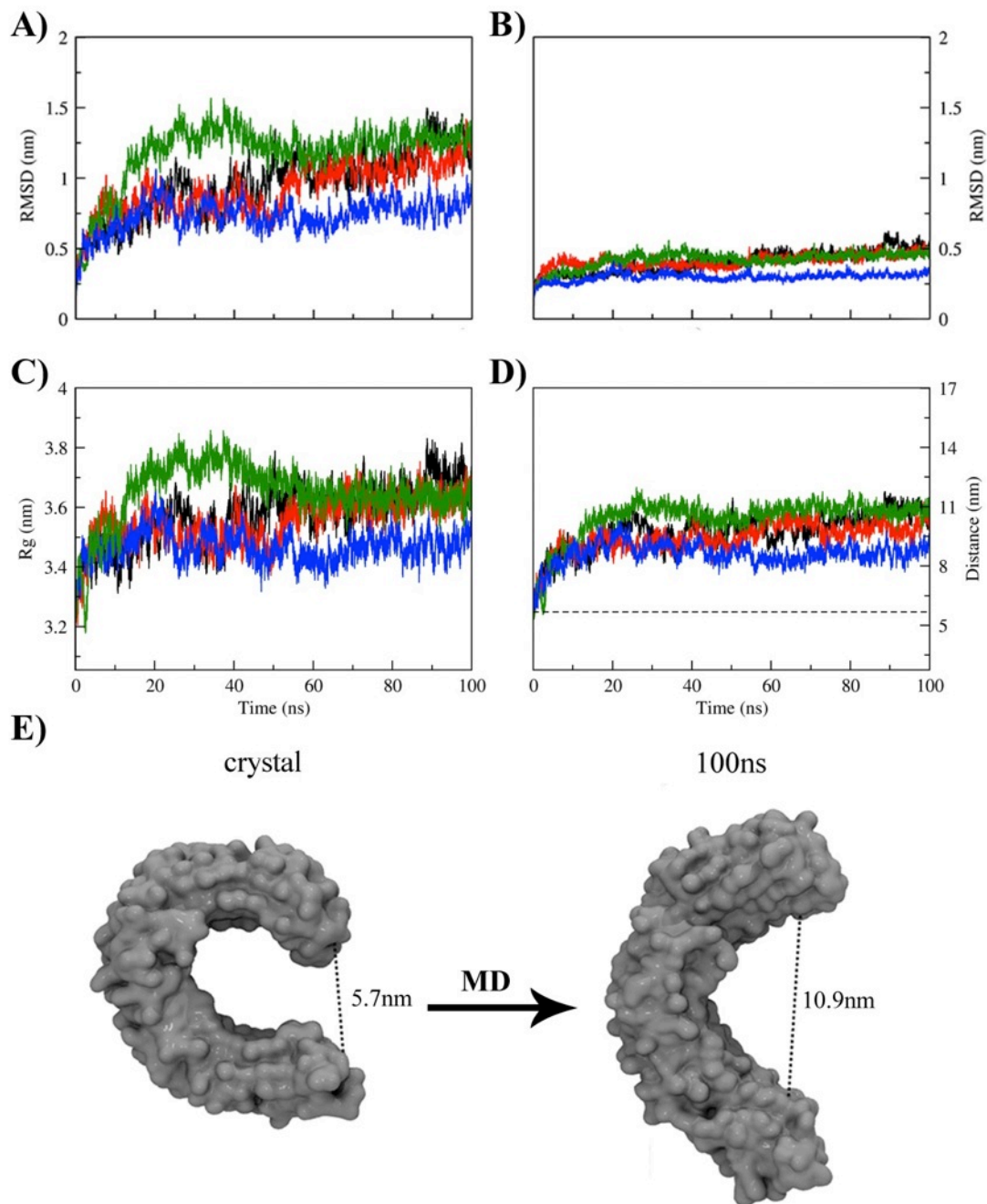


Figure 2. Changes in the hTLR4 structure and conformation. RMSD values for all residues (panel A) and for central residues (150-500, panel B), (C) radius of gyration and (D) the distance between terminal residues of hTLR4 are shown. (hTLR4)₁ is colored as black, (hTLR4 - MD-2)₁ is colored as red, (hTLR4 - MD-2)₂ is colored as blue and (hTLR4)₂ is colored as green. (E) Expansion of the curvature of (hTLR4)₁ during simulations in comparison with the crystal structure.

This flexibility in N- C- terminus is corroborated by B-factor values of these regions in crystals of TLRs, obtained from PDB (Figure 3). The C- terminal portion is the segment connected to the transmembrane helix, which is linked to the intracellular TIR domain. So the higher flexibility of the C-terminal, when compared to the N-terminal, may be related to the absence of the membrane vicinity.

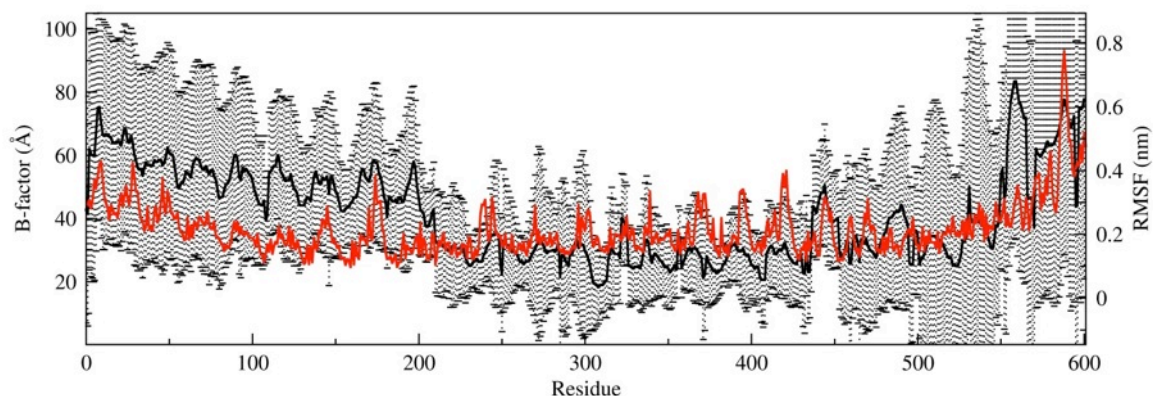


Figure 3. The RMSF values for hTLR4 against B-factor for crystals of TLRs. The RMSF values for (hTLR4 - MD-2)₂ (the same structure utilized for B-factor analysis of hTLR4 crystal) are shown in red curve and the B-factor values in black curve; standard deviation is crosshatch represented in black.

Furthermore, the essential dynamics analysis shows this pattern of residues fluctuation as the one most frequent in the different systems (Figure S3). This analysis revealed the three most frequent patterns of residues fluctuation along MD for hTLR4, being the first component (most occurrence), the one that shows major flexibility in the terminal domains. The other two more frequent components for residues fluctuations in the MD of hTLR4, were also close proximal in all simulated systems and, despite the lower flexibility in the terminal domains as compared with the first component, they were all representative of the little oscillation of the central residues, showing as more free to move, the terminal domains (Figure S3). Also, the

eigenvectors, generated by NMA, show the predicted large-amplitude collective motion of the hTLR4 in which an opening of the horseshoe-like structure tends to occur (Figure S4).

Dynamical Network Analysis of hTLR4. The high connectivity between residues within N- or C-terminal regions indicates that they participate in the same cluster of movement and, consequently, are involved in the flexibility from one to another.

Systems that lack MD-2, presented a more pronounced correlation between the nodes in the N- terminal domain than the ones that have this protein associated (Figure 4). Additionally, the convex region of the horseshoe-like structure shows little concentration of residues with higher correlation, showing a network of connected residues mainly with the same weight (Figure 4).

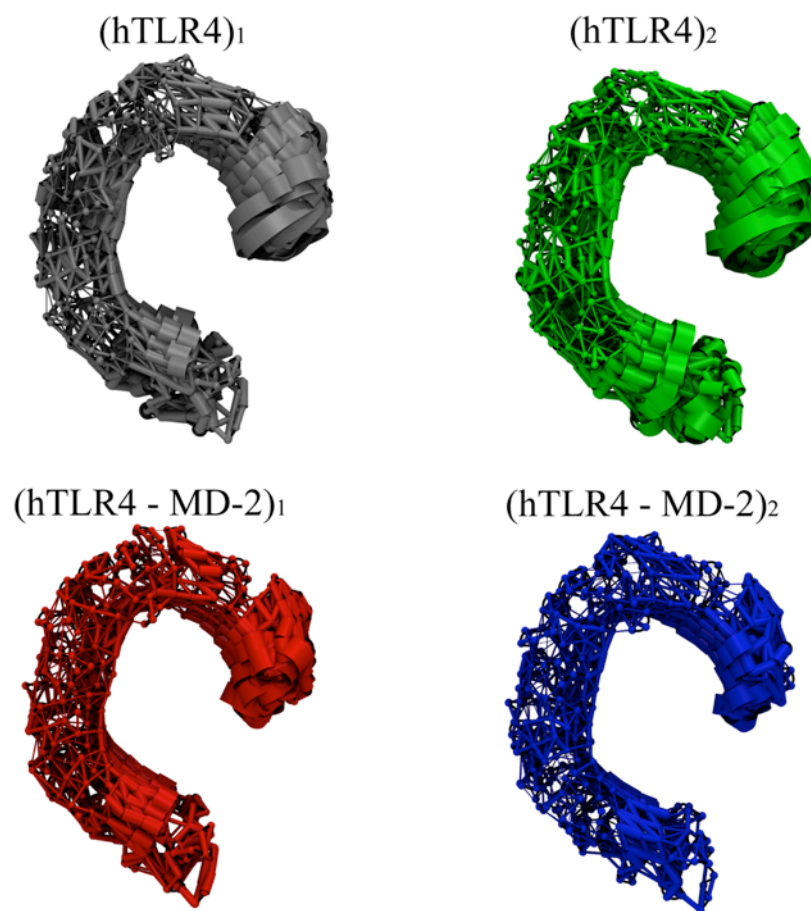


Figure 4. Network analysis for hTLR4. The network analysis for the hTLR4 (chain A) present in the different systems is shown. The correlation between the residues movement of hTLR4 monomer is shown for the four systems in order of weight. Thereby, thicker lines evidence the more correlated movement components.

Furthermore, the N- and C-terminal portions belong to different communities of residues, indicating that motions on each terminal are not directly linked.

The co-receptor dynamics. While the receptor presented higher flexibility mostly in its terminal regions, the co-receptor showed a different flexibility pattern (Figure 5A-B). As in hTLR4 systems, secondary structure content of MD-2 shows that no denaturation in the protein structure occurs (Figure S5).

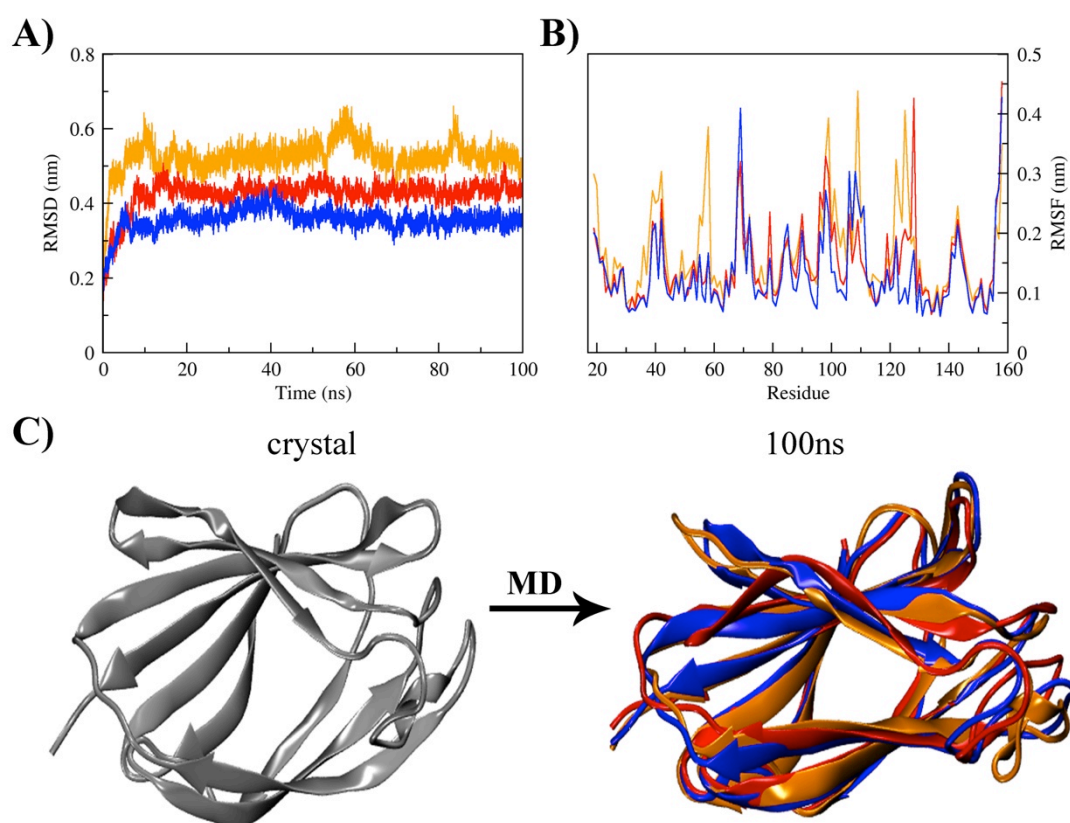


Figure 5. Changes in the MD-2 structure and conformation. (A) RMSD and (B) RMSF values for MD-2 present in the different systems simulated, represented as following:

MD-2 in (hTLR4 - MD-2)₁: red; in (hTLR4 - MD-2)₂: blue; and in (MD-2)₁: orange. (C) Cartoon representation of the crystallographic coordinates of MD-2 (shown in gray), used as starting point of simulations, in comparison with the resulting conformation of this protein in the different systems simulated after MD (the same color pattern as (A) and (B) were used), showing the decrease in the hydrophobic pocket of this protein in all systems.

The high flexibility of MD-2 residues produced a decrease in the hydrophobic cavity of this molecule (Figure 5C and Figure S6). This pattern of residues fluctuation in MD-2 was sustained in the three systems that it was present, besides the lower values in system (hTLR4 - MD-2)₂, indicating that this complexation induces a more stable complex.

The major differences in residues fluctuation between systems rely on residues involved in loops (Figure S7), wherein, in system (MD-2)₁ the fluctuation of Lys109 and the region comprising residues Lys55 to Lys58 was higher in comparison to the others. Additionally, residue Lys128 in (hTLR4 - MD-2)₁ also showed a pronounced flexibility when compared to the other systems (Figure 5B). We also observed a marked similarity in residues fluctuations between Ile124 to Lys127 (constituent of the F126 loop of MD-2, at the dimerization interface) of the systems (hTLR4 - MD-2)₁ and (MD-2)₁ (Figure 5B).

Systems Complexation. We investigate the distance between proteins along time in the different oligomerized systems looking for how the flexibility of the constituent proteins has influenced in its oligomerization. We consider both, homo oligomerization [as in hTLR4_A - hTLR4_B dimer, present in systems (hTLR4)₂ and (hTLR4 - MD-2)₂], as hetero oligomerization [as hTLR4 - MD-2, present in systems (hTLR4 - MD-2)₁ and (hTLR4 - MD-2)₂]. The (hTLR4 - MD-2)₁ presented a tendency of fluctuation of the distance between

hTLR4 and MD-2 along time, which is more stable in the (hTLR4 - MD-2)₂, despite both converges at the end of simulation (Figure 6A).

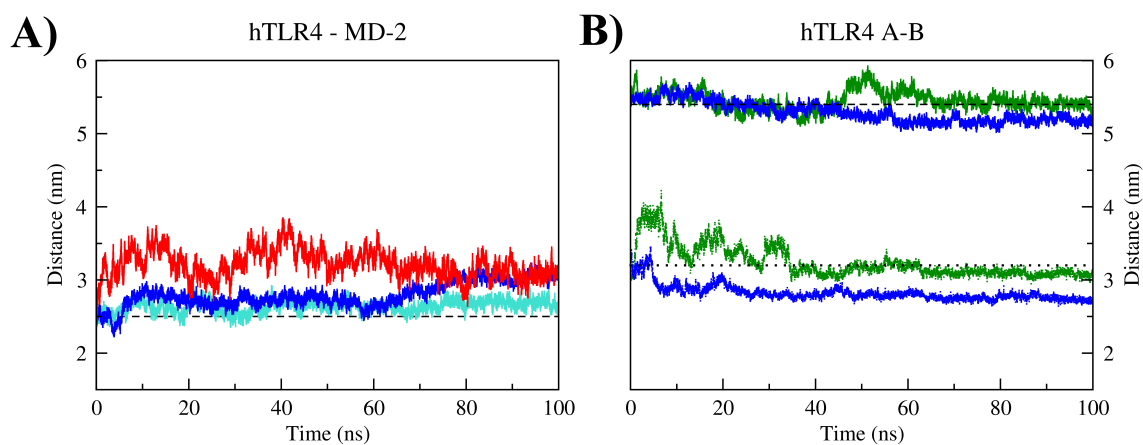


Figure 6. Distance between constituents proteins of the oligomerized systems. (A) Distance between hTLR4 and MD-2 along time in the systems (hTLR4 - MD-2)₁, colored in red, and (hTLR4 - MD-2)₂, colored in blue for chain A and cyan for chain B, are shown. Dashed lines indicate the reference value of the crystal distance between these proteins. (B) Distance between hTLR4 monomers (A and B) along time in the systems (hTLR4)₂, colored in green and (hTLR4 - MD-2)₂, colored in blue, are shown. Dashed black lines indicate the reference value of the crystal distance between these proteins. The dotted lines at the bottom of this graphic show this analysis with specific C-terminal regions of these proteins (the same colors as in the analysis with the whole protein were applied).

Apparently, the receptor dimerization (hTLR4 - hTLR4) influences the stability of the oligomerization hTLR4 - MD-2, conferring smaller distances between these two proteins when hTLR4 is in the dimeric state than when it is present in the monomeric form. Additionally, in the oligomerization of hTLR4 as a dimer, both systems tend to approximate their hTLR4 monomers to each other (Figure 6B), and this approximation is more pronounced in the C-terminal region, wherein, when the monomers open their horseshoe shaped domain, this

region becomes closer to each other (Figure 6B and Table S3). Also, energies between the monomers in the different oligomerizations of hTLR4, present different tendencies, in which, with the approximation of the monomers of hTLR4, the interaction between them increases, while in the distancing of hTLR4 - MD-2 the interaction decreases (Figure S8).

DISCUSSION

In the LPS recognition, besides a few exceptions, it is known that hTLR4 act as a heterodimer with MD-2 and that LPS-binding induces hTLR4 - MD-2 dimerization [14]. However, in the case of other ligands (see Table S1) such as fungal polysaccharides, little is known about the way recognition is done. In some cases, it has been reported that MD-2 may not be essential or even present [7, 13]. This question brings out interrogations about what would be the form of oligomerization of hTLR4 in these cases and also, what differences should the receptor suffer whilst in the absence of the co-receptor. In this study we investigate four systems porting hTLR4, aiming to analyze the influence of MD-2 on hTLR4 structure and conformation, and also the influence of different forms of oligomerization of hTLR4 for the dynamical behavior of this protein.

In the MD simulations of hTLR4 (alone or in its complexes), the receptor showed a pronounced flexibility, showing a final structure (after MD) different from crystal data. This high flexibility showed by hTLR4 seems to be associated with its terminal regions, which yielded a tweezers-like movement indicated, in previous works, in a lesser extent. In that previous work, Kubarenko and coworkers [28] detected that a homology model of hTLR4 presented an opening of 8.5 nm in its ECD in 10ns of simulation (measured by N- and C-terminal ends). Here, with extended simulations, we identified that hTLR4 fluctuations seems to be dependent on MD-2 presence (Figure 2, Figure 4 and Table S2), which tends to stabilize the horseshoe shaped structure. This tendency of the hTLR4, could represent an evidence of

the overall movement of this receptor in biological solutions and could bring an insight of the predisposition of movement performed by the receptor when approximating its intracellular domains, for intracellular signaling, an already known necessary event to signal transduction [1, 29, 30].

Also, B-factor analyses helped in the connection of the observed behavior of hTLR4 in MD with the experimental crystallographical data, as similarly observed for other works [31, 32, 33], attesting a pattern in the residues fluctuation (see Figure 3). Additionally, the opening tendency of the horseshoe-like structure showed by NMA and essential dynamics of the hTLR4, reinforce the tendency observed.

The dynamical network analysis permits the identification of groups of residues that have their movement linked or dependent along the MD. This way, groups of residues (represented by nodes) are bound by links (that represent interactions between element pairs), which have a weight that characterizes their strength (affinity, intensity or probability). This way, correlated motions of these regions are defined [34, 35]. Performing this correlation for all systems, it was shown that the lacking of MD-2 leads to a more pronounced correlation between nodes of the N- terminal domain than the correlation present in systems in which hTLR4 associates with MD-2. This pattern of nodes correlation shows difference in the MD-2 presence that could influence the overall behavior of the hTLR4 systems. Also, these data reveal that the movements seen for the terminal regions do not seem to be directly related. Moreover, the networks representation of the convex part of hTLR4 shows that this region seems to present a high quantity of interlinked residues with similar weight that apparently have their movement not directly dictated by the hTLR4 terminal regions.

The closing trend of the hydrophobic pocket of MD-2, observed in all simulated systems, are supported by a recent study with this molecule, employing MD with a time simulation scale of 10ns, which also reported this closing tendency, and noticed that it occurs even in the

presence of ligands [36]. This performance of MD-2 indicates features of the remodeling plasticity of this co-receptor in different complexes in biological solutions.

Also, residues between the interval of Lys124 to Lys127 are involved in the formation of the loop that reside between the dimerization interface of MD-2 and TLR4 [14], so this could be a possible reason why the (hTLR4 - MD-2)₂ system presented the lowest values of residue fluctuation between this interval, once, in this system, the interval of residues (Lys124 to Lys127) are not free to move as in the other systems [(hTLR4 - MD-2)₁ and (MD-2)₁]. In (hTLR4 - MD-2)₂, the MD-2 encounters the physical barrier of the presence of the monomer of hTLR4 (of opposite chain) (Figure S9). The marked fluctuation in Lys109, and between the interval of Lys55 to Lys58 in (MD-2)₁ must be due to the exposure of these residues in this free in solution system. Furthermore, Lys109 belongs to a loop of MD-2 that interact with the monomer of hTLR4 of correspondent chain, which is absent in this system. The interval between Lys55 to Lys58 constitutes a sequence of residues proximal to the aforecited loop of the dimerization interface and also is linked with the β -strand 4 of MD-2 (Figure S7), which is connected to a loop near the monomer of hTLR4 of correspondent chain (which is also absent in this system) (Figure S9).

Our results also point that different oligomerization of hTLR4 could differently contribute to the hTLR4 oligomerization stability. The systems porting the oligomerization hTLR4_A - hTLR4_B [(hTLR4)₂ and (hTLR4 - MD-2)₂] tends to approximate their monomers to each other, while the monomers of the hetero systems [(hTLR4 - MD-2)₁ and (hTLR4 - MD-2)₂] tends to became distant along the time (Table S3). Also, interaction between monomers of the hTLR4 tends to increase along time, while between hTLR4 and MD-2, decrease. This could happen due to the importance of formation the dimeric form of hTLR4, as an approach of guarantee the intracellular signal transduction [29], once the MD-2 could have its fundamental activity as an inductor of hTLR4 dimerization beyond ligand recognition [37]. This could be

also highlighted by the fact that the portion that became more close to each other along time is the C-terminal portion of hTLR4 which is linked to the transmembrane helix, connecting extra- and intracellular domains of the receptor [38].

Besides the apparent stabilizing function of the opening of the horseshoe-shaped domain of TLR4 by MD-2, it could also have activity in changing the correlation of the receptor residues, possibly signaling different oligomerization.

Thereby, constantly progress has been made in the field of innate immunity and also, more specifically, regarding TLRs family. However, studies concerning the structural and dynamical proprieties of these complexes are still needed and little available. This work aims to contribute with better comprehension of this information and also tends to help future studies regarding ligands recognition by these complexes. In this way, the results showed in this study can be extrapolated to other ones covering LPS and other described ligands of hTLR4 (-MD-2).

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) of the Brazil government, the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) of the Brazil government and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Supporting Information

Supporting Information Available

REFERENCES

- [1] Kang, J. Y., and Lee, J. O. (2011) Structural biology of the Toll-like receptor family, *Annu. Rev. Biochem.* 80, 917-941.
- [2] Chang, Z. L. (2010) Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways, *Inflamm. Res.* 59, 791-808.
- [3] Bryant, C. E., Spring, D. R., Gangloff, M., and Gay, N. J. (2010) The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide, *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 8-14.
- [4] Beg, A. A. (2002) Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses, *Trends Immunol.* 23, 509-512.
- [5] Taylor, K. R., and Gallo, R. L. (2006) Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 20, 9-22.
- [6] Levitz, S. M. (2004) Interactions of Toll-like receptors with fungi, *Microbes Infect.* 6, 1351-1355.
- [7] Figueiredo, R. T., Bittencourt, V. C., Lopes, L. C., Sasaki, G., and Barreto-Bergter, E. (2012) Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) recognize polysaccharides of *Pseudallescheria boydii* cell wall, *Carbohydr. Res.* 356, 260-264.
- [8] Bell, J. K., Mullen, G. E., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R., and Segal, D. M. (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors, *Trends Immunol.* 24, 528-533.
- [9] Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K., and Satow, Y. (2007) Crystal Structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa, *Science* 316, 1632-1634.

- [10] Carpenter, S., and O'Neill, L. A. (2009) Recent insights into the structure of Toll-like receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins, *Biochem. J.* 422, 1-10.
- [11] Barata, T. S., Teo, I., Brocchini, S., Zloh, M., and Shaunak, S. (2011) Partially glycosylated dendrimers block MD-2 and prevent TLR4-MD-2-LPS complex mediated cytokine responses, *Plos Comput. Biol.* 7, 1-13.
- [12] Roh, E., Lee, H. S., Kwak, J. A., Hong, J. T., Nam, S. Y., Jung, S. H., Lee, J. Y., Kim, N. D., Han, S. B., and Kim, Y. MD-2 as the target of nonlipid chalcone in the inhibition of endotoxin LPS-induced TLR4 activity, *J. Infect. Dis.* 203, 1012-1020.
- [13] Leal, S. M. Jr., Vareechon, C., Cowden, S., Cobb, B. A., Latgé, J. P., Momany, M., and Pearlman, E. (2012) Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection, *J. Clin. Invest.* 122, 2482-2498.
- [14] Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H., and Lee, J. O. (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4 - MD-2 complex, *Nature* 458, 1191-1195.
- [15] Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008) GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.* 4, 435-437.
- [16] Oostenbrink, C., Villa, A., Mark, A. E., and van Gunsteren, W. F. (2004) A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53a5 and 53a6, *J. Comput. Chem.* 25, 1656-1676.

- [17] Pol-Fachin, L., Franco Becker, C., Almeida Guimarães, J., and Verli, H. (2011) Effects of glycosylation on heparin binding and antithrombin activation by heparin, *Proteins* 79, 2735-2745.
- [18] Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R., and Straatsma, T. P. (1987) The missing term in effective pair potentials, *J. Phys. Chem.* 91, 6269–6271.
- [19] Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J.C., and Fraaije, J. G. E. M. (1997) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations, *J. Comput. Chem.* 18, 1463-1472.
- [20] Feenstra, K. A., Hess, B., and Berendsen, H. J. C. (1999) Improving efficiency of large time-scale molecular dynamics simulations of hydrogen-rich systems, *J. Comput. Chem.* 20, 786-798.
- [21] Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., Dinola, A., and Haak, J. R..(1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81, 3684-3690.
- [22] Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.* 98, 10089-10092.
- [23] Thompson, J. A., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive choice, *Nucl. Acids Res.*, 22, 4673-4680.
- [24] Frishman, D., and Argos, P. (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment, *Proteins* 23, 566-579.
- [25] Laskowski, R. A. (2009) PDBsum new things, *Nucleic. Acids Res.* 37, D355-359.
- [26] Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14, 33-38.

- [27] Hollup, S. M., Sælensminde, G., and Reuter, N. (2005) WEBnm@: a web application for normal mode analysis of proteins, *BMC Bioinformatics* 6, 52.
- [28] Kubarenko, A., Frank, M., and Weber, A. N. (2007) Structure-function relationships of Toll-like receptor domains through homology modelling and molecular dynamics, *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1515-1518.
- [29] Núñez Miguel, R., Wong, J., Westoll, J. F, Brooks, H. J, O'Neill, L. A., Gay, N. J., Bryant, C. E., and Monie, T. P. (2007) A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLoS One* 2, 1-12.
- [30] Mann, D. L. (2011) The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls, *Circ. Res.* 108, 1133-1145.
- [31] Yuan, Z., Bailey, T. L, and Teasdale, R. D. (2005) Prediction of protein B-factor profiles, *Proteins* 58, 905-912.
- [32] Stocker, U., Spiegel, K., and van Gunsteren, W. F. (2000) On the similarity of properties in solution or in the crystalline state: a molecular dynamics study of hen lysozyme, *J Biomol NMR* 18, 1-12.
- [33] Spiwok, V., Lipovová, P., Skálová, T., Dusková, J., Dohnálek, J., Hasek, J., Russell, N. J., and Králová, B. (2007) Cold-active enzymes studied by comparative molecular dynamics simulation, *J Mol Model* 13, 485-497.
- [34] Amitai, G., Shemesh, A., Sitbon, E., Shklar, M., Netanel, D., Venger, I., and Pietrokovski, S. (2004) Network analysis of protein structures identifies functional residues, *J. Mol. Biol.* 344, 1135-1146.

[35] Böde, C., Kovács, I. A., Szalay, M. S., Palotai, R., Korcsmáros, T., and Csermely, P. (2007) Network analysis of protein dynamics, *FEBS Lett.* 581, 2776-2782.

[36] Garate, J. A., and Oostenbrink, C. (2012) Lipid a from lipopolysaccharide recognition: Structure, dynamics and cooperativity by molecular dynamics simulations, *Proteins* 81, 658-674.

[37] Christiansen, D., Brekke, O. L., Stenvik, J., Lambris, J. D., Espevik, T., and Mollnes, T. E. (2012) Differential effect of inhibiting MD-2 and CD14 on LPS- versus whole *E. coli* bacteria- induced cytokine responses in human blood, *Adv. Exp. Med. Biol.* 946, 237-251.

[38] Vandenberg, A., Teraguchi, S., Akira, S., Takeda, K., and Standley, D. M. (2012) Systems biology approaches to toll-like receptor signaling, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 4, 497-507.

Supporting Information

Table S1. Current recognized ligands of hTLR4 [1-8].

Current Recognized Ligands hTLR4	
Exogenous	Endogenous
LPS, Fusion protein- respiratory syncytial virus, Bacillus Calmette-Guérin (BCG), <i>cryptococcal</i> glucuronoxylomannan, <i>C. albicans</i> o-linked mannosyl residues, <i>Trypanosoma</i> glycoinositolphospholipids, mannans, α -glucans, PTX (paclitaxel)	HSPs, HMGB1, β -defensin, Biglycan, Hyaluronan, Heparan sulfate, OxPAPC, Fibrinogen, Fibronectin, Angiotensin II, Fetuin A

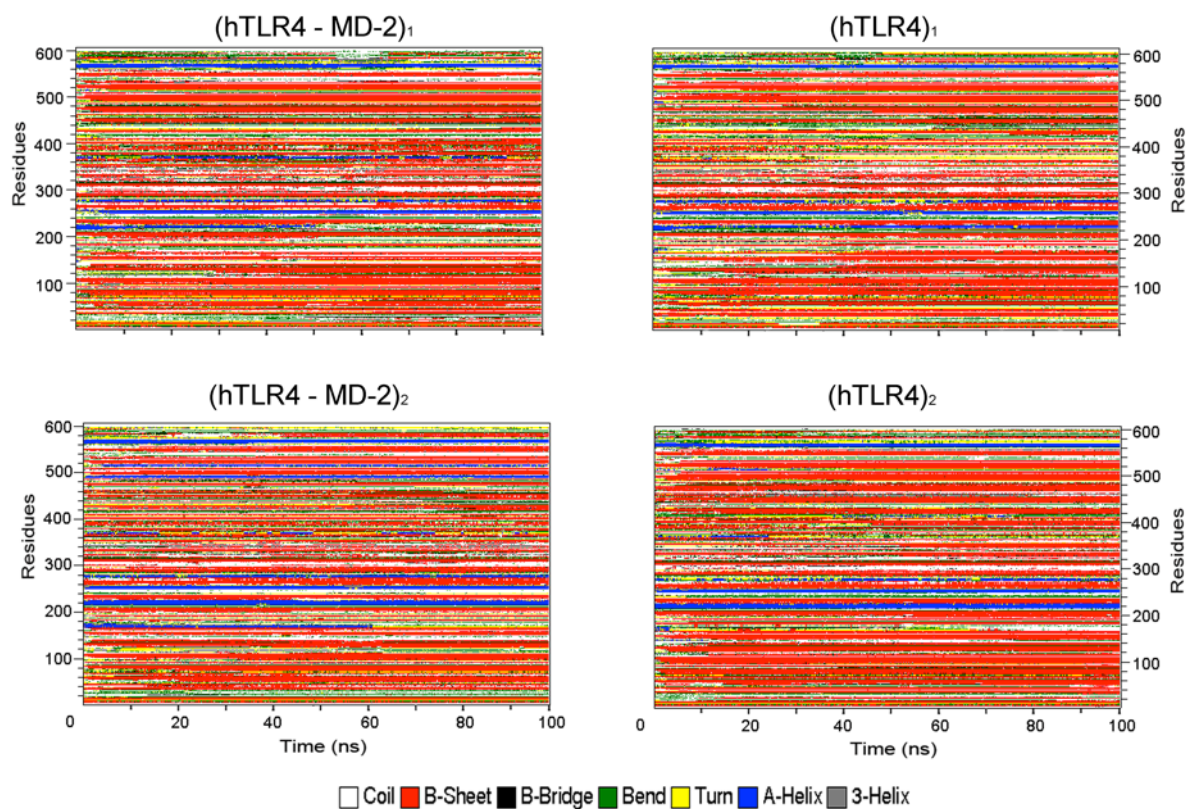


Figure S1. Maintenance of the hTLR4 Secondary Structure. The analyses of the secondary structure content of hTLR4, in the different systems simulated, show that the structure of the receptor did not undergo denaturation over the MD. The legend for the graphs is shown below them.

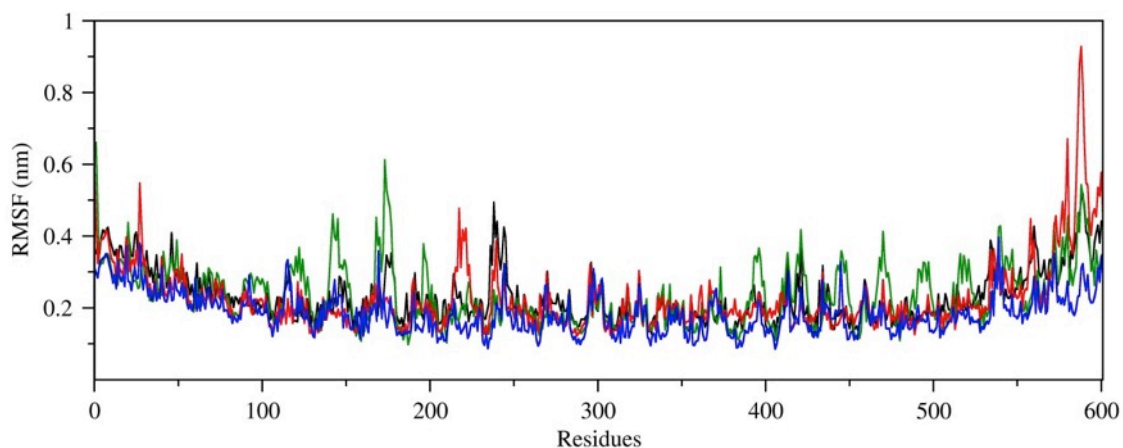


Figure S2. RMSF analyses of hTLR4. RMSF analyses as a function of both residue number and time for hTLR4 in the four systems that it was present indicates that the major flexibility in this protein is concentrated in its terminal residues (especially in the first 150 residues and in the last 100). These set of more flexible residues were removed for the RMSD analysis of the receptor. Systems are colored as follow: (hTLR4 - MD-2)₁: red line; (hTLR4)₁: black line; (hTLR4 - MD-2)₂: blue line; and (hTLR4)₂: green line.

Table S2. Opening of the horseshoe-like structure in the different systems. The general values (Å) and percentage (%) of the opening showed for hTLR4 structure in comparison to the initial opening (measured by the distance between N- and C- terminal residues; Glu27 and Cys627) are shown. Data generated with [9].

Opening of the horseshoe-like domain	Å	Crystal			
			56.8		
Å	%	After MD - 100ns			
		(hTLR4) ₁	(hTLR4) ₂	(hTLR4 - MD-2) ₁	(hTLR4 - MD-2) ₂
		109.2	107.8	104.8	94.2
		92	90	84	66

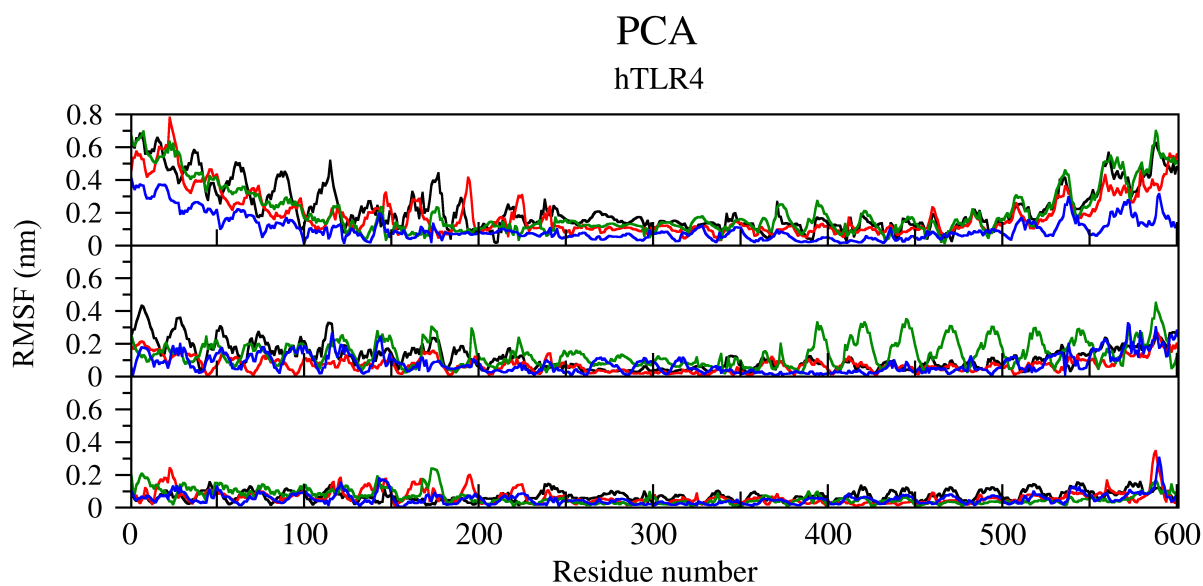
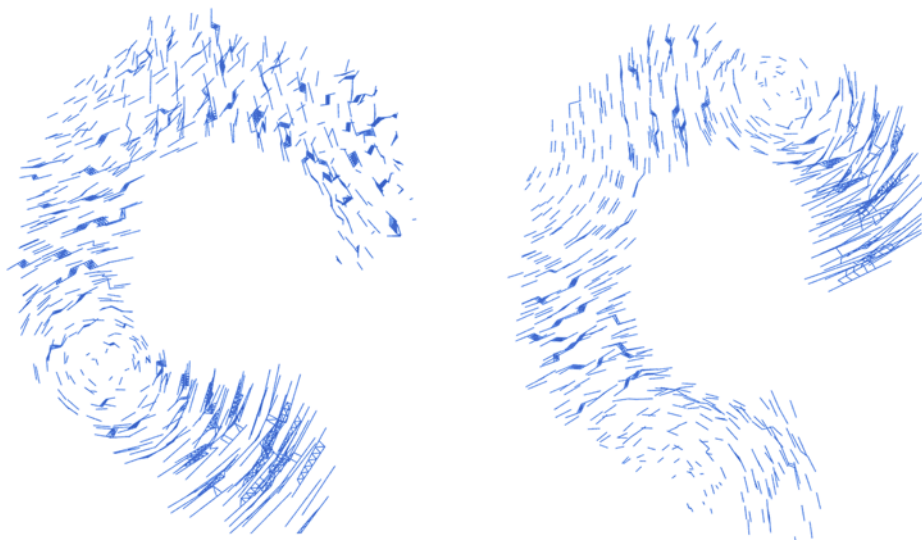


Figure S3. Essential Dynamics of hTLR4. Principal Component Analysis were performed for the MD of hTLR4 in the different systems. The three most frequent components exhibited for hTLR4 in the different systems are show in order of frequency. Systems are colored as follow: (hTLR4 - MD-2)₁: red line; (hTLR4)₁: black line; (hTLR4 - MD-2)₂: blue line; and (hTLR4)₂: green line.

A)

NMA



B)

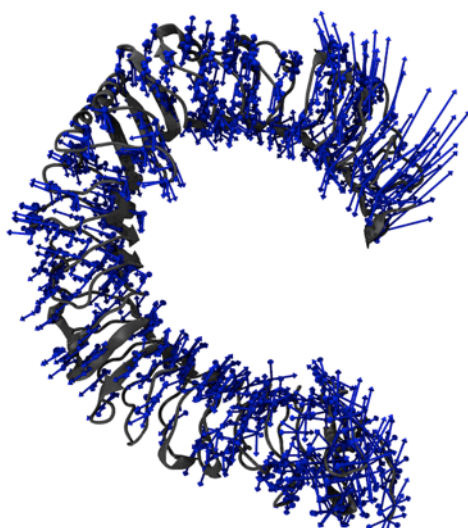


Figure S4. Normal Modes Analysis of hTLR4. (A) Shows the two modes that presents the lowest values of deformation energy generated for the monomer of hTLR4, present in the crystal structure 3FXI. (B) Shows the eigenvectors sum of the normal modes of hTLR4, indicating the direction of the tendency of movement of the protein residues. The hTLR4 monomer is shown in gray while vectors are represented in blue. Data generated with [10].

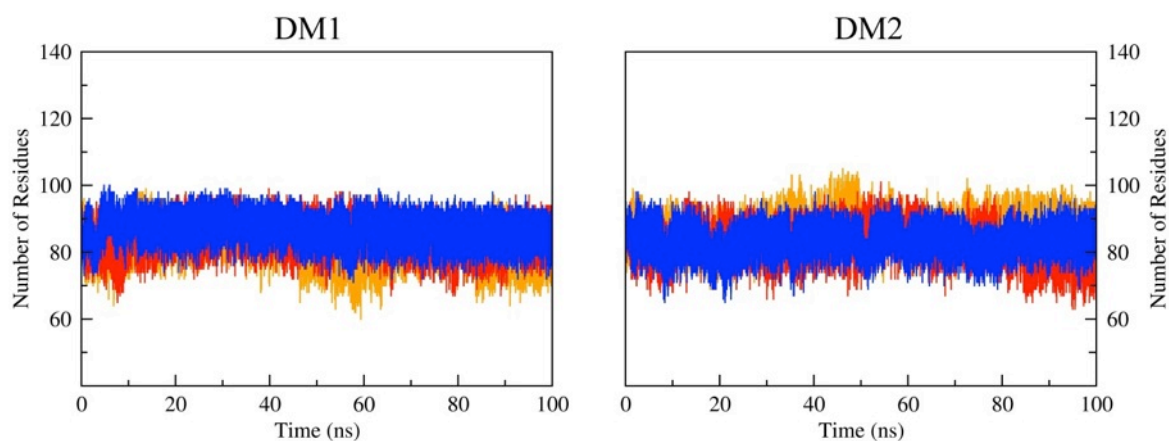


Figure S5. Maintenance of the MD-2 Secondary Structure. The results show that the structure of the co-receptor, in both experiments made (DM1: first simulations and DM2: duplicates), in all systems porting MD-2, did not undergo denaturation over the MD. The red lines represents (hTLR4 - MD-2)₁; the blue lines: (hTLR4 - MD-2)₂; and the orange lines: (MD-2)₁.

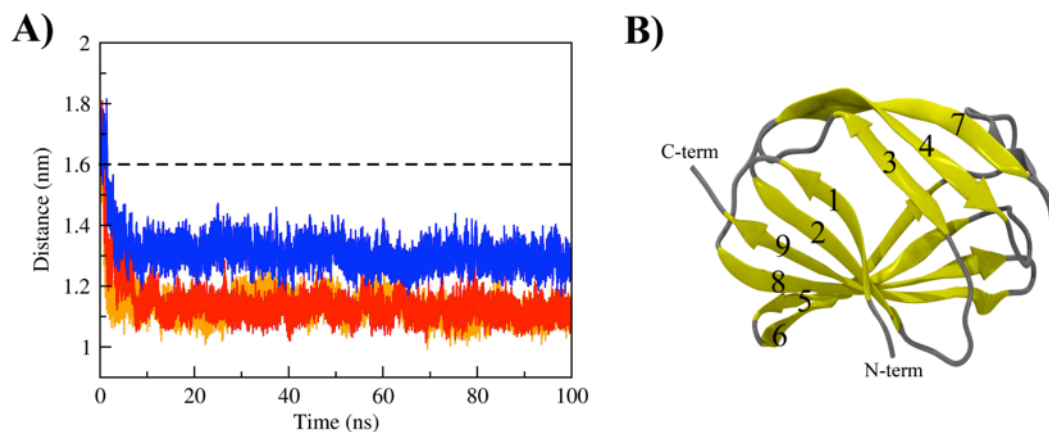


Figure S6. Decrease in the hydrophobic pocket of MD-2. (A) The analysis of the distance, along the simulations, between the two β -sheets that forms the MD-2 pocket was performed. Results show the approximation between these two regions. The red line represents (hTLR4 - MD-2)₁; the blue line, (hTLR4 - MD-2)₂; the orange line, (MD-2)₁; and the dashed line, the reference distance in the crystal structure. (B) Shows a schematic representation of the constituents β -strands (colored in yellow) of the two β -sheets of MD-2 (represented in cartoon), used for the distance analysis shown in (A). The strands were consecutively numbered from N- to C- terminal, and the two β -sheets are formed by groups of strands 1, 2, 9, 8, 5, 6 and 3, 4, 7 respectively. The remaining structure of MD-2 is shown in gray.

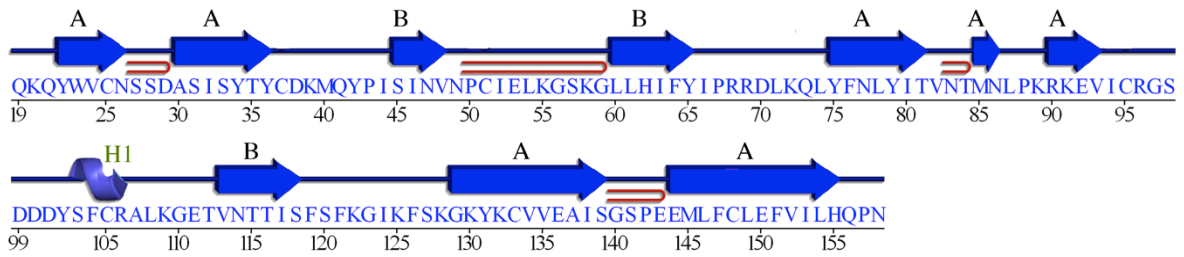


Figure S7. Secondary Structure Content of MD-2. The secondary structure succession of the crystal of MD-2 is show in blue, in which helix and sheets are label as H1 (in dark green) and, A and B (in black), respectively. The residues identification is shown in blue, for amino acids sequece, and black, for the correspondent number of the amino acid; β -hairpin are shown in red. Data generated with [11].

Table S3. Monomers interaction in the oligomerization. Comparison between the monomers interaction in the crystal structure and after MD (at 100ns). Data generated with [11].

System	Interaction	Chain	N° of interface residues	Interface area (Å ²)	N° of H bonds	N° of non-bonded contact
Crystal		hTLR4_A		581	7	39
		hTLR4_B	11	579		
(hTLR4 - MD-2) ₂	TLR4 - TLR4	hTLR4_A		1838	26	189
		hTLR4_B	36	1892		
(hTLR4) ₂		hTLR4_A	26	1557	16	116
		hTLR4_B	22	1590		
Crystal		hTLR4_A	25	978	21	152
		MD-2_A	20	1085		
		hTLR4_B	19	1028	15	174
		MD-2_B	19	1159		
(hTLR4 - MD-2) ₁	TLR4 - MD-2	hTLR4_A	15	662	6	68
		MD-2_A	13	694		
(hTLR4 - MD-2) ₂		hTLR4_A	10	389	5	44
		MD-2_A	7	458		
		hTLR4_B	12	688	7	41
		MD-2_B	11	716		

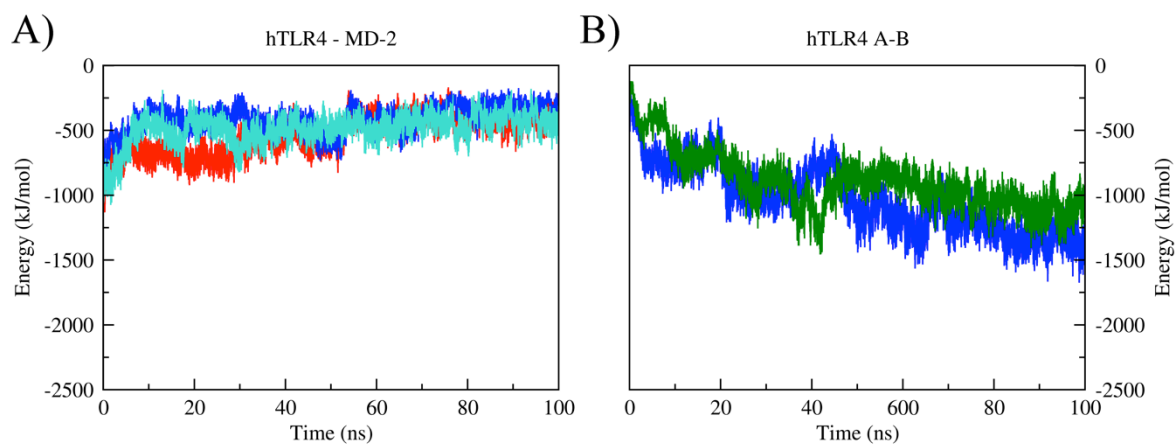


Figure S8. Interaction energies between oligomers constituents. (A) Shows the interaction energies between hTLR4 and MD-2 present in the systems: $(\text{hTLR4} - \text{MD-2})_1$, shown in red, and $(\text{hTLR4} - \text{MD-2})_2$, shown in blue and cyan, for chains A and B of hTLR4 - MD-2, respectively. (B) Shows the interaction energies between the monomers A and B of hTLR4, present in the systems: $(\text{hTLR4} - \text{MD-2})_2$, shown in blue, and $(\text{hTLR4})_2$, shown in green.

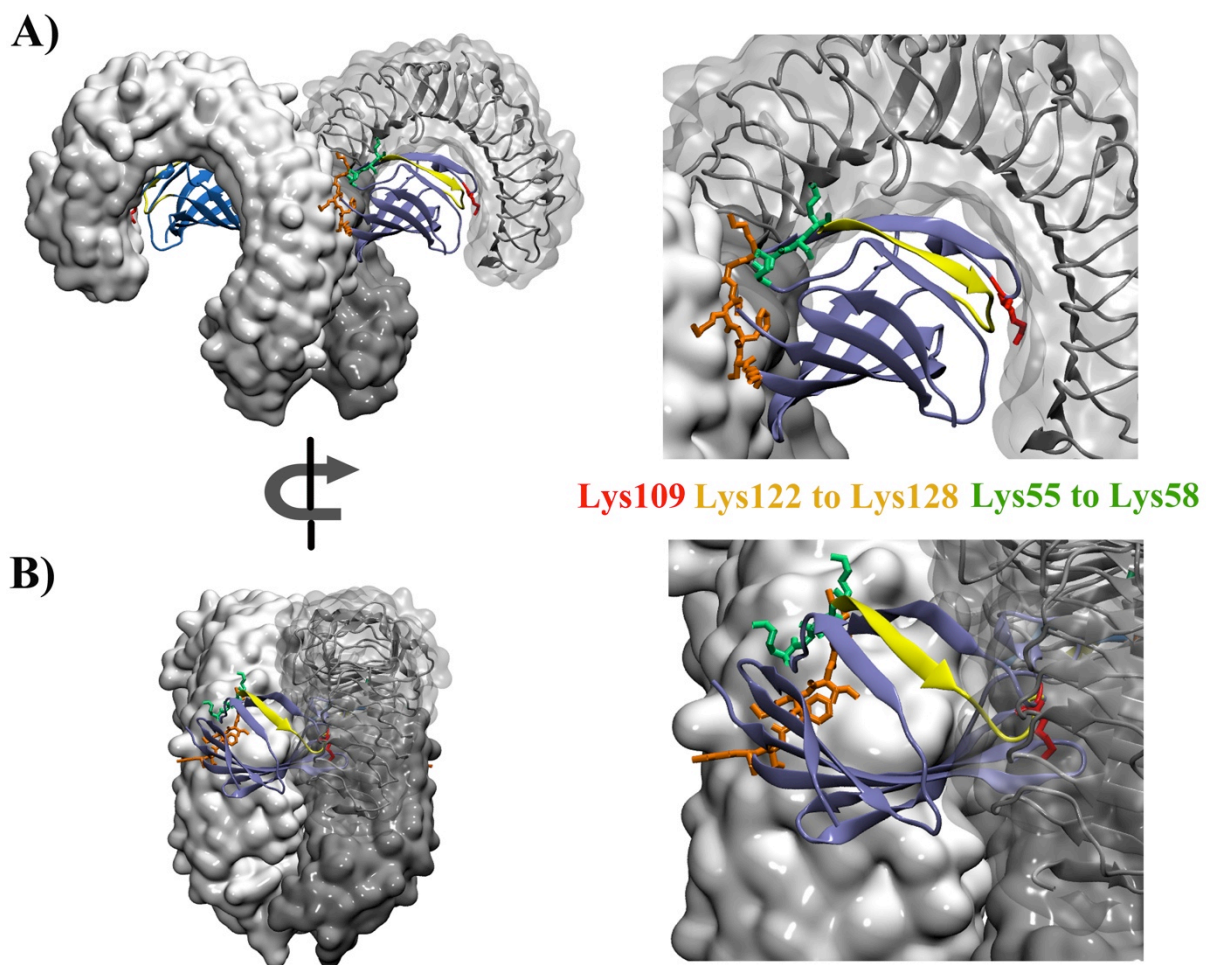


Figure S9. Residues of MD-2 with highlighted flexibility. The lateral view (A) and top view (B) of $(\text{hTLR4} - \text{MD-2})_2$ system are shown, wherein the monomers of hTLR4 are shown in molecular surface representation, colored in gray (chain A) and white (chain B). With the purpose of facilitating the visualization, a portion of the monomer A of hTLR4, in the N-terminal domain, is represented in transparent molecular surface and evidenced in cartoon. MD-2 is shown in cartoon representation, in which chain A and chain B, are colored in violet and blue, respectively. In both monomers of MD-2, residues that possess high flexibility in the RMSF analysis are highlighted, colored as follows: Lys109, in red; Lys122 to Lys128, in orange; and Lys55 to Lys58 in green. The previously cited β strand 4 of MD-2 is colored in yellow. On the right of both figures (A and B) is shown a zoom view of the referred residues in the same position as shown in the left.

REFERENCES

- [1] Erridge, C. (2010) Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants?, *J. Leukoc. Biol.* 87, 989-999.
- [2] Kawai, T., and Akira, S. (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity, *Immunity*. 34, 637-650.
- [3] Leal, S. M. Jr., Vareechon, C., Cowden, S., Cobb, B. A., Latgé, J. P., Momany, M., and Pearlman, E. (2012) Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection, *J. Clin. Invest.* 122, 2482-2498.
- [4] Leal, S. M. Jr., Cowden, S., Hsia, Y. C., Ghannoum, M. A., Momany, M., and Pearlman, E. (2010) Distinct roles for Dectin-1 and TLR4 in the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* keratitis, *PLoS Pathog.* 6, 1-16.
- [5] Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., Ray, S., Majumdar, S. S., and Bhattacharya S. (2012) Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance, *Nat. Med.* 18, 1279-1285.
- [6] Figueiredo, R. T., Bittencourt, V. C., Lopes, L. C., Sasaki, G., and Barreto-Bergter, E. (2012) Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) recognize polysaccharides of *Pseudallescheria boydii* cell wall, *Carbohydr. Res.* 356, 260-264.
- [7] Shoham, S., Huang, C., Chen, J. M., Golenbock, D. T., and Levitz, S. M. (2001) Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule, *J. Immunol.* 166, 4620-4626.
- [8] Begg, A. A. (2002) Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune response, *Trends Immunol.* 23, 509-512.

- [9] Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14, 33-38.
- [10] Hollup, S. M., Sælensminde, G., and Reuter, N. (2005) WEBnm@: a web application for normal mode analysis of proteins, *BMC Bioinformatics* 6, 52.
- [11] Laskowski, R. A. (2009) PDBsum new things, *Nucleic. Acids Res.* 37, 355-359.

Discussão Geral

4.2 Validação dos estudos de DM com o hTLR4

A confiabilidade das predições na DM depende, basicamente, de dois fatores: da adequação do campo de força utilizado para o sistema em estudo e, que a busca do espaço conformacional realizada durante a simulação seja suficientemente ampla para descrever as conformações relacionadas ao processo em estudo (van Gunsteren *et. al.*, 1992). Em geral, a validação dos dados obtidos reside, principalmente, na comparação dos resultados gerados a propriedades experimentais conhecidas (van Gunsteren *et. al.*, 1990; Karplus *et. al.*, 1990).

Particularmente no caso dos estudos da dinâmica da complexação hTLR4 - MD-2, as simulações permitiram a observação de fenômenos que podem ser confirmados por dados disponíveis, como: 1) verificação de abertura do ECD do sistema monomérico de hTLR4 (Kubarenko *et al.*, 2007); e 2) fechamento do poço hidrofóbico de MD-2, o qual, recentemente, foi divulgada a mesma observação para esta proteína em simulações na presença e na ausência de hTLR4, em estudos por DM em uma escala de tempo 10x menor (Garate & Oostenbrink, 2012). Ainda, a correspondente confirmação dos dados nas duplicatas evidencia a reprodutibilidade dos dados gerados (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Dados comparativos de análises das duplicatas para o receptor hTLR4 nos diferentes sistemas em que este se encontrava e para as duas cadeias do mesmo.

Sistemas	Cadeias	Réplicas	RMSD (nm)		Raio de Giro (nm)	Estrutura 2 ^a 3	RMSF (nm)	Oligomerização				
			todos os resíduos	resíduos centrais (150-500)				hTLR4 - hTLR4			hTLR4 - MD-2	
								Distância		Energia	Distância	Energia
								Total	C-terminal			
(hTLR4 - MD-2) ₁	A	1	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.0	3.5 ± 0.1	354	0.2 ± 0.1	-	-	-	3.21 ± 0.19	-531 ± 149.0
		2	1.2 ± 0.3	0.5 ± 0.1	3.7 ± 0.1	361	0.1 ± 0.0	-	-	-	3.54 ± 0.23	-485 ± 96.4
(hTLR4) ₁	A	1	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.0	3.6 ± 0.1	364	0.2 ± 0.1	-	-	-	-	-
		2	1.1 ± 0.2	0.4 ± 0.0	3.7 ± 0.1	364	0.2 ± 0.1	-	-	-	-	-
(hTLR4 - MD-2) ₂	A	1	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.0	3.5 ± 0.0	356	0.2 ± 0.0	5.3 ± 0.1	2.8 ± 0.1	-1032 ± 258.0	2.8 ± 0.2	-412 ± 99.0
		2	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.0	3.5 ± 0.1	372	0.2 ± 0.1	5.3 ± 0.1	2.9 ± 0.1	-900 ± 281.0	2.7 ± 0.1	-346 ± 137.9
	B	1	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.0	3.5 ± 0.1	358	0.2 ± 0.1	5.3 ± 0.14	2.8 ± 0.1	-1032 ± 258.0	2.6 ± 0.1	-487 ± 114.9
		2	1.1 ± 0.2	0.4 ± 0.0	3.6 ± 0.1	382	0.2 ± 0.1	5.3 ± 0.1	2.9 ± 0.1	-900 ± 281.0	2.7 ± 0.1	-540 ± 123.0
(hTLR4) ₂	A	1	1.2 ± 0.2	0.4 ± 0.0	3.6 ± 0.1	392	0.2 ± 0.1	5.4 ± 0.1	3.2 ± 0.2	-895 ± 218.0	-	-
		2	1.2 ± 0.1	0.4 ± 0.0	3.6 ± 0.1	371	0.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1	2.7 ± 0.1	-1338 ± 265.0	-	-
	B	1	1.3 ± 0.2	0.4 ± 0.0	3.7 ± 0.1	377	0.2 ± 0.1	5.4 ± 0.1	3.2 ± 0.2	-895 ± 218.0	-	-
		2	1.1 ± 0.2	0.5 ± 0.0	3.6 ± 0.1	352	0.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1	2.7 ± 0.1	-1338 ± 265.0	-	-

³ Dados gerados com o programa DSSP do pacote GROMACS (Hess *et al.*, 2008).

Tabela 7. Dados comparativos de análises das duplicatas para a proteína MD-2 nos diferentes sistemas em que esta se encontrava e para as duas cadeias da mesma.

Sistemas	Cadeias	Simulação	RMSD (nm)	Raio de Giro (nm)	Estrutura 2 ^a 4 (res.)	RMSF (nm)
(hTLR4 - MD-2) ₁	A	DM1	0.4 ± 0.0	1.6 ± 0.0	90	0.1 ± 0.1
		DM2	0.4 ± 0.0	1.6 ± 0.0	75	0.2 ± 0.1
(hTLR4 - MD-2) ₂	A	DM1	0.3 ± 0.0	1.5 ± 0.0	82	0.1 ± 0.1
		DM2	0.4 ± 0.0	1.5 ± 0.0	88	0.2 ± 0.1
	B	DM1	0.4 ± 0.0	1.6 ± 0.0	87	0.1 ± 0.1
		DM2	0.3 ± 0.0	1.5 ± 0.0	87	0.2 ± 0.1
(MD-2) ₁	A	DM1	0.5 ± 0.0	1.6 ± 0.0	86	0.2 ± 0.1
		DM2	0.4 ± 0.0	1.6 ± 0.0	83	0.2 ± 0.1

4.3 Importância dos estudos com o hTLR4

Notavelmente, todos os organismos multicelulares expressam receptores celulares tipo Toll ou semelhantes aos mesmos, que sintonizam microrganismos e iniciam reações de defesa contra os mesmos (Abbas, 2012). Vários estudos têm demonstrado o importante papel dos TLRs e seus homólogos na iniciação da resposta imune inata contra patógenos em uma série de organismo (Chang, 2010). A manutenção desses receptores ao longo do processo evolutivo evidencia a fundamental importância dessas proteínas no sistema de defesa de diferentes organismos.

Estudos acerca do comportamento dinâmico destes receptores são consideravelmente válidos para obtenção de *insights* que poderão auxiliar a traçar o comportamento dessas proteínas em diversos processos, tais como reconhecimento de ligantes, sinalização intracelular, entre outros. A utilização da abordagem de estudos de DM para melhor compreensão de fenômenos biológicos tem sido amplamente empregada nos mais diversos campos de estudo, tendo atuado como

⁴ Análise realizada com o programa DSSP do pacote GROMACS (Hess *et al.*, 2008).

uma importante ferramenta no estudo do comportamento molecular de uma série de sistemas biológicos (Hansson *et. al.*, 2002).

No presente trabalho, buscando contribuir no estudo estrutural e conformacional do receptor hTLR4, diferentes formas de oligomerização do mesmo foram traçadas. Os sistemas portando o co-receptor, (hTLR4 - MD-2)₁ e (hTLR4 - MD-2)₂, foram delineados a fim de avaliar a influência dessa proteína no comportamento geral do receptor. Assim, esses sistemas objetivaram contribuir com informações acerca das formas oligoméricas do hTLR4 disponíveis em meio biológico. Já os sistemas do hTLR4 que não continham MD-2, (hTLR4)₁ e (hTLR4)₂, além de funcionarem como um controle dos sistemas que portavam MD-2, contribuíram no estudo de diferentes formas de oligomerização do hTLR4, fornecendo dados do comportamento dinâmico dessa proteína nos diferentes estados. Ainda, como estudos tem mostrado a possibilidade de atuação do hTLR4 na ausência do MD-2 e, nestes casos, sob uma forma de oligomerização do receptor desconhecida, esses complexos tem ainda potencial para contribuir com dados acerca de uma possível forma alternativa de dimerização de hTLR4 nesses casos. Por fim, o sistema (MD-2)₁ foi planejado como forma de controle da proteína MD-2 nos dois sistemas que a portavam.

Os dados obtidos neste trabalho evidenciam o estudo de diferentes formas de oligomerização do receptor hTLR4 bem como a análise das propriedades dinâmicas desses complexos. Através dessas análises foi possível investigar como as diferentes formas de oligomerização do hTLR4 influenciaram no comportamento do mesmo em solução aquosa, mimetizando o ambiente fisiológico. Ademais, além da importância da informação estrutural do hTLR4, obtida pela estrutura cristalográfica 3FXI, essencial para um maior entendimento a respeito da biologia estrutural deste receptor, dados dinâmicos dessa proteína, como a observação do padrão de flutuação de seus resíduos ao longo do tempo, bem como a relação entre este evento e os fenômenos observados, como a análise de movimentos coletivos da molécula, ou correlação entre os resíduos dessa proteína, são fornecidos pelas simulações por DM e ampliam, consideravelmente, o espectro de informações acerca do receptor bem como evidenciam novos potenciais desenhos de estudo com o mesmo.

Desta forma, as características dinâmicas das proteínas em estudo, obtidas no presente trabalho, possibilitam a utilização desses dados para estudos comparativos

com outros membros da família de hTLRs, na busca de padrões comportamentais dessa proteína, atuando como um estudo base para geração de novos dados. No entanto, futuros estudos mostram-se necessários para elucidação dos resultados obtidos como um padrão para essa família de receptores e, ainda, para investigação da influência dos demais domínios de hTLR4 no comportamento do mesmo. Todavia, a metodologia de DM empregada, que utiliza programas gratuitos, e implementados com algoritmos de simulação rápidos, pode contribuir no entendimento dos diversos processos biológicos aos quais estão envolvidos estes receptores (como a dinâmica dos mesmos em solução, reconhecimento de ligantes, entre outros), gerando novos *insights* acerca destes processos.

5 Conclusões

Considerando os objetivos propostos, o presente trabalho permitiu:

- Caracterizar o comportamento conformacional do hTLR4, em solução aquosa, sob diferentes formas de oligomerização, livre ou em complexo com o co-receptor MD-2;
- Identificar o movimento do domínio extracelular do hTLR4, o qual comporta-se semelhante a uma pinça;
- Observação de tendência de fechamento do poço hidrofóbico de MD-2, dado este corroborados por trabalho recentemente divulgado;

6 Perspectivas

Considerando-se os procedimentos e os resultados obtidos no presente trabalho, podem ser traçadas como perspectivas:

- Estudos entre os complexos estudados neste trabalho associados a seus ligantes;
- Avaliação de outras formas de oligomerização do hTLR4, como o heterodímero hTLR4-hTLR2;
- Caracterização do comportamento conformacional da porção extracelular de outros membros da família de TLR;
- Caracterização da interação do hTLR4 com membranas biológicas, avaliando a influência da mesma para o comportamento conformacional observado para este receptor em solução aquosa.

7 Referências Bibliográficas

- Abbas, K. A.; Lichtman, A. H.; Pillai, S.: Cellular and Molecular Immunology, 7. ed., Philadelphia: Elsevier, **2011**.
- Abel, B.; Thieblemont, N.; Quesniaux, V. J.; Brown, N.; Mpagi, J.; Miyake, K.; Bihl, F.; Ryffel, B.: Toll-Like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J. Immunol.*, **2002**, 169, 3155-3162.
- Abreu, M. T.; Arnold, E. T.; Thomas, L. S.; Gonsky, R.; Zhou, Y.; Hu, B.; Arditi, M.: TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 20431-20437.
- Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O.: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.*, **2006**, 124, 783-801.
- Anderson, K. V.; Bokla, L.; Nusslein-Volhard, C.: Establishment of dorsalventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell.*, **1985**, 42, 791-798.
- Bell, J. K.; Botos, I.; Hall, P. R.; Askins, J.; Shiloach, J.; Segal, D. M.; Davies, D. R.: The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, 102, 10976-10980.
- Bell, J. K.; Mullen, G. E.; Leifer, C. A.; Mazzoni, A.; Davies, D. R.; Segal, D. M.: Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.*, **2003**, 24, 528-533.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. In Pullman, B (ed.). *Intermolecular forces*; Dordrecht: Reidel, **1981**, p. 331-342.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; DiNola, A.; Haak, J. R.: Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, **1984**, 81, 3684-3690.
- Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P.: The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.*, **1987**, 91, 6269-6271.
- Belvin, M. P.; Anderson, K. V.: A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **1996**, 2, 393-416.

- Beutler, B.: Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.*, **2004**, 40, 845-59.
- Bianchi, M. E.: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.*, **2007**, 81, 1-5.
- Biragyn, A.; Ruffini, P. A.; Leifer, C. A.; Klyushnenkova, E.; Shakhov, A.; Chertov, O.; Shirakawa, A. K.; Farber, J. M.; Segal, D. M.; Oppenheim, J. J.; Kwak, L. W.: Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science*, **2002**, 298, 1025-1029.
- Blasius, A. L.; Beutler, B.: Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, **2010**, 32, 305-315.
- Brunn, G. J.; Bungum, M. K.; Johnson, G. B.; Platt, J. L.: Conditional signaling by Toll-like receptor 4. *FASEB J.*, **2005**, 19, 872-874.
- Case, D. A.; Cheatham, T. E. 3rd; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M. Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J.: The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J. Comput. Chem.*, **2005**, 26, 1668-1688.
- Chang, Z. L.: Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res.*, **2010**, 59, 791-808.
- Choe, J.; Kelker, M. S.; Wilson, I. A.: Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, **2005**, 309, 581-585.
- Chtarbanova, S.; Imler, J. L.: Microbial sensing by Toll receptors: a historical perspective. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **2011**, 31, 1734-1738.
- Clark, M.; Cramer, R. D.; van Opdenbosch, N.: Validation of the general-purpose Tripos 5.2 force-field. *J. Comput. Chem.*, **1989**, 10, 982-1012.
- Darden, T.; York, D.; Pedersen, L.: Particle Mesh Ewald – an N.log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 10089-10092.
- de Groot, B. L.; Grubmüller, H.: Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, **2001**, 294, 2353-2357.
- DeMarco, M. L.; Woods, R.J.: From agonist to antagonist: structure and dynamics of innate immune glycoprotein MD-2 upon recognition of variably acylated bacterial endotoxins. *Mol Immunol.*, **2011**, 49, 124-133.

- de Sant'Anna, C. M. R.: Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações IUPAC 1997). *Quim. Nova*, **2002**, 25, 505-512.
- de Sant'Anna, C. M. R.: Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. *Rev Virtual Quim.*, **2009**, 1, 49-57.
- Dranoff, G.: Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.*, **2004**, 4, 11-22.
- Erridge, C.: Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants?. *J. Leukoc. Biol.*, **2010**, 87, 989-999.
- Feenstra, K. A.; Hess, B.; Berendsen, H. J. C.: Improving efficiency of large time-scale molecular dynamics simulations of hydrogen-rich systems. *J. Comput. Chem.*, **1999**, 20, 786-798.
- Figueiredo, R. T.; Bittencourt, V. C.; Lopes, L. C.; Sasaki, G.; Barreto-Bergter, E.: Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) recognize polysaccharides of *Pseudallescheria boydii* cell wall. *Carbohydr Res.*, **2012**, 356, 260-264.
- Frishman, D.; Argos, P.: Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins*, **1995**, 23, 566-79.
- Garate, J. A.; Oostenbrink, C.: Lipid a from lipopolysaccharide recognition: Structure, dynamics and cooperativity by molecular dynamics simulations. *Proteins*. **2012**, [Epub ahead of print]; doi: 10.1002/prot.24223.
- Gangloff, M.: Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? *Trends Biochem Sci.*, **2012**, 37, 92-98.
- Gangloff, M.; Murali, A.; Xiong, J.; Arnot, C. J.; Weber, A. N.; Sandercock, A. M.; Robinson, C. V.; Sarisky, R.; Holzenburg, A.; Kao, C.; Gay, N. J.: Structural insight into the mechanism of activation of the Toll receptor by the dimeric ligand Spätzle. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 14629-14635.
- Gay, N. J.; Gangloff, M.: Structure of toll-like receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2008**, 183, 181-200.
- Gay, N. J.; Gangloff, M.: Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu. Rev. Biochem.*, **2007**, 141-165.

- Govindaraj, R. G.; Manavalan, B.; Basith, S.; Choi, S.: Comparative analysis of species-specific ligand recognition in Toll-like receptor 8 signaling: a hypothesis. *PLoS One*, **2011**, 6, 1-15.
- Han, J.; Kim, H. J.; Lee, S. C.; Hong, S.; Park, K.; Jeon, Y. H.; Kim, D.; Cheong, H. K.; Kim, H. S.: Structure-based rational design of a Toll-like receptor 4 (TLR4) decoy receptor with high binding affinity for a target protein. *PLoS One*, **2012**, 7, 1-9.
- Hansson, T.; Oostenbrink, C.; van Gunsteren, W. F.: Molecular dynamics simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2002**, 12, 190-196.
- Harberts, E.; Gaspari, A. A.: TLR Signaling and DNA Repair: Are They Associated? *J. Invest. Dermatol.*, **2013**, 133, 296-302.
- Heinig, M.; Frishman, D.: STRIDE: a Web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucl. Acids Res.*, **2004**, 32, W500-502.
- Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E.: GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.*, **2008**, 4, 435-447.
- Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M.: LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*, **1997**, 18, 1463-1472.
- Hoffmann, J. A.; Reichhart, J. M.: Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.*, **2002**, 3, 121-126.
- Hold, G.L.; El-Omar, E.M.: Genetic aspects of inflammation and cancer. *Biochem J.*, **2008**, 410, 225-235.
- Hopkins, P. A.; Sriskandan, S.: Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin. Exp. Immunol.*, **2005**, 140, 395-407.
- Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K.: VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.*, **1996**, 14, 33-38.
- Jackson, M. R.; Nilsson, T.; Peterson, P. A.: Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.*, **1993**, 121, 317-333.

- Janeway, C. A. Jr.: The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today*, **1992**, 13, 11-16.
- Jin, M. S.; Kim, S. E.; Heo, J. Y.; Lee, M. E.; Kim, H. M., et al.: Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, **2007**, 130, 1071–1082.
- Johnson, G. B.; Brunn, G. J.; Kodaira, Y.; Platt, J. L.: Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.*, **2002**, 168, 5233-5239.
- Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J.: The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 1657-1666.
- Knapp, B.; Lederer, N.; Omasits, U.; Schreiner, W.: vmdICE: a plug-in for rapid evaluation of molecular dynamics simulations using VMD. *J Comput Chem.*, **2010** 31, 2868-28673.
- Kang, J. Y.; Nan, X.; Jin, M. S.; Youn, S. J.; Ryu, Y. H.; Mah, S.; Han, S. H.; Lee, H.; Pail, S. G.; Lee J. O.: Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*, **2009**, 31, 873–884.
- Kang, J. Y.; Lee, J. O.: Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu. Rev. Biochem.*, **2011**, 80, 917-941.
- Karplus, M.; Petsko, G.A.: Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, **1990**, 347, 631-639.
- Kawai, T.; Akira, S.: Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, **2011**, 34, 637-650.
- Kelley, L. A.; Sternberg, M. J.: Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.*, **2009**, 4, 363-371.
- Kim, H. M.; Park, B. S.; Kim, J. I.; Kim, S. E.; Lee, J.; Oh, S. C.; Enkhbayar, P.; Matsushima, N.; Lee, H.; Yoo, O. J.; Lee, J. O.: Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*, **2007**, 130, 906-917.

- Kim, K. H.; Jo, M. S.; Suh, D. S.; Yoon, M. S.; Shin, D. H.; Lee, J. H.; Choi, K. U.: Expression and significance of the TLR4/MyD88 signaling pathway in ovarian epithelial cancers. *World J. Surg. Oncol.*, **2012**, 10, 193.
- Kimbrell, D. A.; Beutler, B.: The evolution and genetics of innate immunity. *Nat. Rev. Genet.*, **2001**, 2, 256-267.
- Kitson, D. H.; Hagler, A. T.: Theoretical-studies of the structure and molecular-dynamics of a peptide crystal. *Biochemistry*, **1988**, 27, 5246-5257.
- Krogh, A.; Larsson, B.; Heijne, G. von; Sonnhammer, E. L. L.: Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, **2001**, 305, 567-580.
- Kubarenko, A.; Frank, M.; Weber, A. N.: Structure-function relationships of Toll-like receptor domains through homology modelling and molecular dynamics. *Biochem. Soc. Trans.*, **2007**, 35, 1515-1518.
- Kumagai, Y.; Akira, S.: Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin. Immunol.*, **2010**, 125, 985-992.
- Kuzmanic, A.; Zagrovic, B.: Determination of ensemble-average pairwise root mean-square deviation from experimental b-factors. *Biophys J.*, **2009**, 98, 861-871.
- Laskowski, R. A.: PDBsum new things. *Nucleic. Acids Res.*, **2009**, 37, D355-359.
- Leach, A. R.: *Molecular Modelling: Principles and Applications*, 2.ed. Cingapura: Longman, **2001**.
- Leal, S. M. Jr.; Pearlman, E.: The role of cytokines and pathogen recognition molecules in fungal keratitis - Insights from human disease and animal models. *Cytokine*, **2012**, 58, 107-111.
- Leal, S. M. Jr.; Vareechon, C.; Cowden, S.; Cobb, B. A.; Latgé, J. P.; Momany, M.; Pearlman, E.: Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. *J. Clin. Invest.*, **2012**, 122, 2482-2498.
- Leal, S. M. Jr.; Cowden, S.; Hsia, Y. C.; Ghannoum, M. A.; Momany, M.; Pearlman, E.: Distinct roles for Dectin-1 and TLR4 in the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* keratitis. *PLoS Pathog.*, **2010**, 6, 1-16.

- Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J. M.; Hoffmann, J. A.: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, **1996**, 86, 973–983.
- Leonard, J. N.; Ghirlando, R.; Askins, J.; Bell, J. K.; Margulies, D. H.; Davies, D. R.; Segal, D. M.: The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2008**, 105, 258–263.
- Leulier, F.; Lemaitre, B.: Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet.*, **2008**, 9, 165-178.
- Litman, G. W.; Rast, J. P.; Fugmann, S. D.: The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **2010**, 10, 543-553.
- Liu, L.; Botos, I.; Wang, Y.; Leonard, J. N.; Shiloach, J.; Segal, D. M.; Davies, D. R.: Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*, **2008**, 320, 379-381.
- Luo, J.; Obmolova, G.; Malia, T. J.; Wu, S. J.; Duffy, K. E.; Marion, J. D.; Bell, J. K.; Ge, P.; Zhou, Z. H.; Teplyakov, A.; Zhao, Y.; Lamb, R. J.; Jordan, J. L.; San Mateo, L. R.; Sweet, R. W.; Gilliland, G. L.: Lateral clustering of TLR3:dsRNA signaling units revealed by TLR3ecd:3Fabs quaternary structure. *J. Mol. Biol.*, **2012**, 421, 112-124.
- MacKerell, A. D. Jr.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L. Jr.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E. 3rd.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M.: All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B.*, **1998**, 102, 3586-3616.
- Manavalan, B.; Basith, S.; Choi, S.: Similar Structures but Different Roles - An Updated Perspective on TLR Structures. *Front. Physiol.*, **2011**, 2, 1-13.
- Maroso, M.; Balosso, S.; Ravizza, T.; Liu, J.; Aronica, E.; Iyer, A. M.; Rossetti, C.; Molteni, M.; Casalgrandi, M.; Manfredi, A. A.; Bianchi, M. E.; Vezzani, A.: Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med.*, **2010**, 16, 413-419.

- McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M.: Dynamics of folded proteins. *Nature*, **1977**, *267*, 585-590.
- Medzhitov, R.; Janeway, C. A. Jr.: Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, **1997**, *91*, 295-298.
- Medzhitov, R.; Janeway, C. A. Jr.: Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, **2002**, *296*, 298-300.
- Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P.; Janeway, C.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **1997**, *388*, 394–397.
- Moresco, E. M.; LaVine, D.; Beutler, B.: Toll-like receptors. *Curr Biol.*, **2011**, *21*, R488-R493.
- Morisato, D.; Anderson, K. V.: The *spatzle* gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal–ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell*, **1994**, *76*, 677–688.
- Núñez Miguel, R.; Wong, J.; Westoll, J. F.; Brooks, H. J.; O'Neill, L. A.; Gay, N. J.; Bryant, C. E.; Monie, T. P.: A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLoS One*, **2007**, *2*, 1-12.
- Nyman, T.; Stenmark, P.; Flodin, S.; Johansson, I.; Hammarström, M.; Nordlund, P.: The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 11861-11865.
- Ohto, U.; Fukase, K.; Miyake, K.; Satow, Y.: Crystal Structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science*, **2007**, *316*, 1632-1634.
- Ohto, U.; Fukase, K.; Miyake, K.; Shimizu, T.: Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **2012**, *109*, 7421-7426.
- Okamura, Y.; Watari, M.; Jerud, E. S.; Young, D. W.; Ishizaka, S. T.; Rose, J.; Chow, J. C.; Strauss, J. F. 3rd.: The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 10229-10233.

- Oliveira, A. C.; Peixoto, J. R.; de Arruda, L. B.; Campos, M. A.; Gazzinelli, R. T.; Golenbock, D. T.; Akira, S.; Previato, J. O.; Mendonça-Previato, L.; Nobrega, A.; Bellio, M.: Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T.cruzi*. *J. Immunol.*, **2004**, 173, 5688-5696.
- Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F.: A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.*, **2004**, 25, 1656-1676.
- Pal, D.; Dasgupta, S.; Kundu, R.; Maitra, S.; Das, G.; Mukhopadhyay, S.; Ray, S.; Majumdar, S. S.; Bhattacharya, S.: Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med.*, **2012**, [Epub ahead of print doi: 10.1038/nm.2851].
- Pancer, Z.; Cooper, M. D.: The evolution of adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **2006**, 24, 497-518.
- Park, B. S.; Song, D. H.; Kim, H. M.; Choi, B. S.; Lee, H.; Lee, J. O.: The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, **2009**, 458, 1191-1195.
- Poltorak, A.; He, X.; Smirnova, I.; Liu, M.; Huffel, C.; Du, X.; Birdwell, D.; Alejos, E.; Silva, M.; Galanos, C.; Freudenberg, M.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Layton, B.; Beutler, B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*, **1998**, 282, 2085-2088.
- Reynolds, J. M.; Martinez, G. J.; Chung, Y.; Dong, C.: Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2012**, 109, 13064-13069.
- Roelofs, M. F.; Boelens, W. C.; Joosten, L. A.; Abdollahi-Roodsaz, S.; Geurts, J.; Wunderink, L. U.; Schreurs, B. W.; van den Berg, W. B.; Radstake, T. R.: Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, **2006**, 176, 7021-7027.

- Sasisekharan, R.; Shriver, Z.; Venkataraman, G.; Narayanasami, U.: Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, **2002**, 2, 521-528.
- Schlick, T.: *Molecular Modeling and Simulation: an Interdisciplinary Guide*, 1.ed. New York: Springer, **2006**.
- Shimazu, R.; Akashi, S.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Fukudome, K.; Myiake, K.; Kimoto M.: MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.*, **1999**, 189, 1777-1782.
- Shoham, S.; Huang, C.; Chen, J. M.; Golenbock, D. T.; Levitz, S. M.: Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J. Immunol.*, **2001**, 166, 4620-4626.
- Smiley, S. T.; King, J. A.; Hancock, W. W.: Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol.*, **2001**, 167, 2887-2894.
- Szajnik, M.; Szczepanski, M. J.; Czystowska, M.; Elishaev, E.; Mandapathil M.; Nowak-Markwitz, E.; Spaczynski, M.; Whiteside, T. L.: TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*, **2009**, 28, 4353-4363.
- Tang, D.; Kang, R.; Coyne, C. B.; Zeh, H. J.; Lotze, M. T.: PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.*, **2012**, 249, 158-175.
- Tao, X.; Xu, Y.; Zheng, Y.; Beg, A. A.; Tong, L.: An extensively associated dimer in the structure of the C713S mutant of the TIR domain of human TLR2. *Biochem Biophys Res Commun.*, **2002**, 299, 216-21.
- Taylor, K. R.; Yamasaki, K.; Radek, K. A.; Di Nardo, A.; Goodarzi, H.; Golenbock, D.; Beutler, B.; Gallo, R. L.: Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 18265-18275.

- Termeer, C.; Benedix, F.; Sleeman, J.; Fieber, C.; Voith, U.; Ahrens, T.; Miyake, K.; Freudenberg, M.; Galanos, C.; Simon, J. C.: Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.*, **2002**, 195, 99-111.
- TheUniProt Consortium. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.*, **2012**, 40, D71-D75.
- Vabulas, R. M.; Ahmad-Nejad, P.; da Costa, C.; Miethke, T.; Kirschning, C. J.; Häcker, H.; Wagner, H.: Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 31332-31339.
- Vabulas, R. M.; Ahmad-Nejad, P.; Ghose, S.; Kirschning, C. J.; Issels, R. D.; Wagner, H.: HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 15107-15112.
- van Gunsteren, W. F.; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D. P.; Glättli, A.; Hünenberger, P. H.; Kastenholz, M. A.; Oostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N. F.; Yu, H. B.: Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2006**, 45, 4064-4092.
- van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C.: Computer Simulations of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1990**, 29, 992-1023.
- van Gunsteren, W. F.; Mark, A. E.: On the interpretation of biochemical data by molecular dynamics computer simulation. *Eur. J. Biochem.*, **1992**, 204, 947-961.
- Vandenbon, A.; Teraguchi, S.; Akira, S.; Takeda, K.; Standley, D. M.: Systems biology approaches to toll-like receptor signaling. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **2012**, 4, 497-507.
- Verli, H.: *Interação heparina-antitrombina: reconhecimento molecular caracterizado por ferramentas de modelagem molecular*. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2005**.

- Xu, Y.; Tao, X.; Shen, B.; Horng, T.; Medzhitov, R.; Manley, J. L.; Tong, L.: Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, **2000**, 408, 111-115.
- Yoon, S. I.; Kurnasov, O.; Natarajan, V.; Hong, M.; Gudkov, A. V.; Osterman, A. L.; Wilson, I. A.: Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science*, **2012**, 335, 859-864.
- Zhou, K.; Kanai, R.; Lee, P.; Wang, H. W.; Modis, Y.: Toll-like receptor 5 forms asymmetric dimers in the absence of flagellin. *J Struct Biol.*, **2012**, 177, 402-409.

8 Apêndice

8.1 Apêndice A

Os arquivos “.mdp” definem parâmetros para as simulações de dinâmica molecular. A seguir são apresentados arquivos “.mdp” empregados em uma das simulações estudadas, a fim de exemplificação.

➤ Etapa de minimização de energia empregando o algoritmo Steepest Descent:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define          =  -DFLEX_SPC
constraints     =  none
integrator      =  steep
nsteps          =  10000
emtol          =  100
emstep         =  0.01
nstcomm        =  1
nstxout         =  250
nstvout         =  1000
nstfout        =  0
nstlog         =  100
nstenergy      =  100
nstlist        =  10
ns_type        =  grid
coulombtype     =  PME
rlist          =  0.9
rcoulomb       =  0.9
rvdw           =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft    =  yes
pme_order      =  4
ewald_rtol     =  1e-5
Tcoupl         =  No
Pcoupl         =  No
compressibility =  4.5e-5
ref_p          =  1.0
gen_vel        =  no
```

➤ Etapa 1 da termalização:

```
;      Input file
;
title          =  Yo
cpp            =  /lib/cpp
define         =  -DPOSRES
constraints    =  all-bonds
integrator     =  md
tinit         =  0.0
dt            =  0.001; ps !
nsteps        =  1000 ; total 1 ps.
nstcomm       =  1
nstxout       =  250
nstvout       =  1000
nstfout       =  0
nstlog        =  100
nstenergy     =  100
nstlist       =  10
ns_type       =  grid
coulombtype   =  PME
rlist         =  0.9
rcoulomb      =  0.9
rvdw          =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft  =  yes
pme_order     =  4
ewald_rtol    =  1e-5
Tcoupl        =  v-rescale
tc-grps       =  Protein SOL NA
tau_t         =  0.1 0.1 0.1
ref_t         =  50 50 50
energygrps    =  Protein SOL NA
Pcoupl        =  berendsen
Pcoupltype    =  isotropic
tau_p         =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p         =  1.0
gen_vel       =  yes
gen_temp      =  50.0
gen_seed      =  173529
```

➤ Etapa 2 da termalização:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define         =  -DFLEX_SPC
constraints    =  all-bonds
integrator     =  md
tinit         =  1.0
dt             =  0.002; ps !
nsteps        =  4500 ; total 9 ps.
nstcomm       =  1
nstxout       =  250
nstvout       =  1000
nstfout       =  0
nstlog        =  100
nstenergy     =  100
nstlist       =  10
ns_type       =  grid
coulombtype   =  PME
rlist         =  0.9
rcoulomb      =  0.9
rvdw          =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft  =  yes
pme_order     =  4
ewald_rtol    =  1e-5
Tcoupl        =  v-rescale
tc-grps      =  Protein SOL NA
tau_t        =  0.1 0.1 0.1
ref_t         =  50 50 50
energygrps   =  Protein SOL NA
Pcoupl       =  berendsen
Pcoupltype   =  isotropic
tau_p        =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p        =  1.0
gen_vel      =  no
gen_temp     =  50.0
gen_seed     =  173529
```

➤ Etapa 3 da termalização:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define          =  -DFLEX_SPC
constraints     =  all-bonds
integrator      =  md
tinit          =  10.0
dt             =  0.002; ps !
nsteps         =  2500 ; total 5 ps.
nstcomm        =  1
nstxout        =  250
nstvout        =  1000
nstfout        =  0
nstlog         =  100
nstenergy      =  100
nstlist        =  10
ns_type        =  grid
coulombtype    =  PME
rlist          =  0.9
rcoulomb       =  0.9
rvdw           =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft   =  yes
pme_order      =  4
ewald_rtol     =  1e-5
Tcoupl         =  v-rescale
tc-grps        =  Protein SOL NA
tau_t          =  0.1 0.1 0.1
ref_t          =  100 100 100
energygrps     =  Protein SOL NA
Pcoupl         =  berendsen
Pcoupltype     =  isotropic
tau_p          =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p          =  1.0
gen_vel        =  no
gen_temp       =  100.0
gen_seed       =  173529
```

➤ Etapa 4 da termalização:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define         =  -DFLEX_SPC
constraints    =  all-bonds
integrator     =  md
tinit         =  15.0
dt            =  0.002; ps !
nsteps        =  2500 ; total 5 ps.
nstcomm       =  1
nstxout       =  250
nstvout       =  1000
nstfout       =  0
nstlog        =  100
nstenergy     =  100
nstlist       =  10
ns_type       =  grid
coulombtype   =  PME
rlist         =  0.9
rcoulomb      =  0.9
rvdw          =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft  =  yes
pme_order     =  4
ewald_rtol    =  1e-5
Tcoupl        =  v-rescale
tc-grps       =  Protein SOL NA
tau_t         =  0.1 0.1 0.1
ref_t         =  150 150 150
energygrps    =  Protein SOL NA
Pcoupl        =  berendsen
Pcoupltype    =  isotropic
tau_p         =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p         =  1.0
gen_vel       =  no
gen_temp      =  150.0
gen_seed      =  173529
```

➤ Etapa 5 da termalização:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define          =  -DFLEX_SPC
constraints     =  all-bonds
integrator      =  md
tinit          =  20.0
dt             =  0.002; ps !
nsteps         =  2500 ; total 5 ps.
nstcomm        =  1
nstxout        =  250
nstvout        =  1000
nstfout        =  0
nstlog         =  100
nstenergy      =  100
nstlist        =  10
ns_type        =  grid
coulombtype    =  PME
rlist          =  0.9
rcoulomb       =  0.9
rvdw           =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft   =  yes
pme_order      =  4
ewald_rtol     =  1e-5
Tcoupl         =  v-rescale
tc-grps        =  Protein SOL NA
tau_t          =  0.1 0.1 0.1
ref_t          =  200 200 200
energygrps     =  Protein SOL NA
Pcoupl         =  berendsen
Pcoupltype     =  isotropic
tau_p          =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p          =  1.0
gen_vel        =  no
gen_temp       =  200.0
gen_seed       =  173529
```

➤ Etapa 6 da termalização:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define          =  -DFLEX_SPC
constraints     =  all-bonds
integrator      =  md
tinit          =  25.0
dt             =  0.002; ps !
nsteps         =  2500 ; total 5 ps.
nstcomm        =  1
nstxout        =  250
nstvout        =  1000
nstfout        =  0
nstlog         =  100
nstenergy      =  100
nstlist        =  10
ns_type        =  grid
coulombtype    =  PME
rlist          =  0.9
rcoulomb       =  0.9
rvdw           =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft   =  yes
pme_order      =  4
ewald_rtol     =  1e-5
Tcoupl         =  v-rescale
tc-grps        =  Protein SOL NA
tau_t          =  0.1 0.1 0.1
ref_t          =  250 250 250
energygrps     =  Protein SOL NA
Pcoupl         =  berendsen
Pcoupltype     =  isotropic
tau_p          =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p          =  1.0
gen_vel        =  no
gen_temp       =  250.0
gen_seed       =  173529
```

➤ Etapa 7 da termalização:

```
;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define          =  -DFLEX_SPC
constraints     =  all-bonds
integrator      =  md
tinit          =  30.0
dt             =  0.002; ps !
nsteps         =  2500 ; total 5 ps.
nstcomm        =  1
nstxout        =  250
nstvout        =  1000
nstfout        =  0
nstlog         =  100
nstenergy      =  100
nstlist        =  10
ns_type        =  grid
coulombtype    =  PME
rlist          =  0.9
rcoulomb       =  0.9
rvdw           =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft   =  yes
pme_order      =  4
ewald_rtol     =  1e-5
Tcoupl         =  v-rescale
tc-grps        =  Protein SOL NA
tau_t          =  0.1 0.1 0.1
ref_t          =  300 300 300
energygrps     =  Protein SOL NA
Pcoupl         =  berendsen
Pcoupltype     =  isotropic
tau_p          =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p          =  1.0
gen_vel        =  no
gen_temp       =  300.0
gen_seed       =  173529
```


➤ Exemplo de etapa de dinâmica sob temperatura constante:

```

;      Input file
;
title           =  Yo
cpp             =  /lib/cpp
define         =  -DFLEX_SPC
constraints    =  all-bonds
integrator     =  md
tinit         =  35.0
dt            =  0.004      ; ps !
nsteps        =  241250
nstcomm       =  1
nstxout       =  250
nstvout       =  1000
nstfout       =  0
nstlog        =  100
nstenergy     =  100
nstlist       =  10
ns_type       =  grid
coulombtype   =  PME
rlist         =  0.9
rcoulomb      =  0.9
rvdw          =  0.9
fourierspacing =  0.12
optimize_fft  =  yes
pme_order     =  4
ewald_rtol    =  1e-5
Tcoupl        =  v-rescale
tc-grps       =  Protein SOL NA+
tau_t         =  0.1 0.1 0.1
ref_t         =  310 310 310
energygrps    =  Protein SOL NA+
Pcoupl        =  berendsen
Pcoupltype    =  isotropic
tau_p         =  0.5
compressibility =  4.5e-5
ref_p         =  1.0
gen_vel       =  no
gen_temp      =  310.0
gen_seed      =  173529
constraint_algorithm =  lincs
lincs-iter    =  1
lincs-order   =  6
comm_mode     =  linear

```

Curriculum Vitæ

Os itens II, III e IV restringem-se a atividades realizadas durante o período abrangido pela presente dissertação.

I. Formação acadêmica:

Graduação em Ciências Biológicas- Bacharelado- pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, de 2006/2 a 2010/2. Estudos de Simulação por Dinâmica e Docagem Molecular da Enzima Corismato Sintase de *Plasmodium falciparum*. Orientador: Prof. Dr. Osmar Norberto de Souza.

II. Trabalhos científicos apresentados em congressos

Carvalho de Aguiar, C. ; Verli, H. (2012) Characterizing Human Toll-Like Receptor 4 Dynamics in Solution. Programas e Resumos da XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, C-16. XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 19 a 22 de maio de 2012, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

III. Participação em cursos no exterior

Scoula Superiore D'Immunologia Ruggero Ceppellini. Advanced Course: Innate Immunity 2012: From Evolution to Revolution, de 31 de Outubro a 3 de Novembro de 2012, Sorrento, NA, Itália.

IV. Bolsa recebida:

Bolsista CAPES do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo Centro de Biotecnologia da UFRGS, a partir de março de 2011.
