

PROYECTO DEL DIPLOMA

Bioinformática: Métodos y aplicaciones.

Estudio de las estructuras de
receptores transmembrana:
rodopsinas

Proyecto del diploma

Estudio de las estructuras de receptores transmembrana: rodopsinas

Ramón Tamarit Agustí

Ramon.tamarit@telefonica.net
rtamarita@uoc.edu

Tabla de contenido

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	DEFINICIÓN DEL CLIENTE DEL PROYECTO Y LOS RECURSOS	2
3	DETERMINACIÓN DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	3
3.1	LA GUÍA DE ESTUDIO:	3
3.2	REFORMULACIÓN DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO.	4
4	DISTRIBUCIÓN DE TIEMPOS	6
5	NORMAS DE REDACCIÓN Y CONTENIDO DEL PROYECTO.....	8
1	INTRODUCCIÓN A LAS REDES DE SEÑALIZACIÓN CELULAR Y RECEPTORES	
	TRANSMEMBRANA.	9
1.1	COMUNICACIÓN CELULAR.....	9
1.2	LOS RECEPTORES DE SEÑAL.....	11
1.2.1	<i>Características de los receptores:.....</i>	<i>12</i>
1.3	TIPOS DE COMUNICACIÓN CELULAR.....	12
1.3.2	<i>Comunicación de organismos unicelulares.....</i>	<i>12</i>
1.3.3	<i>Comunicación intercelular en organismos multicelulares.....</i>	<i>12</i>
1.3.4	<i>Sistemas de comunicación celular.....</i>	<i>13</i>
1.4	CONCEPTO DE RECEPTOR FARMACOLÓGICO.	13
1.5	INTERACCIÓN DEL RECEPTOR CON EL FÁRMACO.....	14
1.6	FAMILIAS DE RECEPTORES	15
2	LA MEMBRANA CELULAR Y LOS RECEPTORES TRANSMEMBRANA.....	17
2.1	LA MEMBRANA CELULAR.	17
2.1.1	<i>Funciones biológicas de las membranas.....</i>	<i>17</i>
2.1.2	<i>Estructura de las membranas. El modelo del Mosaico Fluido.....</i>	<i>18</i>
2.2	INTRODUCCIÓN A LAS PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA.....	19
2.3	TIPOS DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA SEGÚN SU ESTRUCTURA	20
2.4	TRANSMEMBRANA UNIPASO	20
2.5	TRANSMEMBRANA MULTIPASO.....	21
2.6	FUNCIONES GENERALES DE LAS PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA.....	22
2.7	FAMILIAS FUNCIONALES DE LOS RECEPTORES TRANSMEMBRANA	23
2.7.3	<i>Receptores ligados a enzimas. 1 dominio transmembrana:</i>	<i>23</i>
2.7.4	<i>Receptores tipo Canal. Con 4 dominios transmembrana.....</i>	<i>23</i>
2.7.5	<i>Receptores asociados a proteínas G . 7 dominios transmembrana:.....</i>	<i>24</i>
2.8	IMPORTANCIA FARMACOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA.....	25
3	BIOFÍSICA DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA. INTERACCIONES CON LA	
	MEMBRANA.....	26
3.1	NATURALEZA DINÁMICA DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA.....	27
3.2	INSERCIÓN DE CARGAS EN EL INTERIOR DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA.	27
3.3	EL MODULADO DE LAS FUNCIÓN PROTEICAS POR LOS LÍPIDOS Y FOSFOLÍPIDOS.	27
3.4	EL ENSAMBLADO DE LAS PROTEÍNAS EN LA MEMBRANA.	30
3.5	LAS VARIACIONES DE ENERGÍA DEL MEDIO DETERMINAN EL CAMINO DE REACCIÓN DE LAS	
	PROTEÍNAS DE MEMBRANA.	31

4	RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRS).....	32
4.1	INTRODUCCIÓN.....	32
4.2	CLASIFICACIÓN DE LOS GPCRS.....	32
4.2.1	<i>Elementos comunes de los GPCRS</i>	33
4.2.2	<i>La importancia del residuo N-Terminal</i>	36
4.2.3	<i>La clasificación de IUPHAR</i>	36
4.3	TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LOS GPCRS.....	37
4.3.4	<i>Estructuras disponibles mediante métodos de difracción y RMN</i>	37
4.3.5	<i>Técnicas bioquímicas</i>	40
4.4	ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LA RODOPSINA COMO MODELO DE LOS GPCRS.....	41
4.4.6	<i>Importancia de la Rodopsina como modelo de GPCRS</i>	41
4.4.7	<i>Ciclo de activación de la rodopsina</i>	42
4.4.8	<i>Estructura cristalina en el estado basal de la rodopsina. Estado inactivo</i>	43
4.4.9	<i>Estructura cristalina en el estado activo de la rodopsina</i>	46
4.5	ENTENDIENDO EL ESTADO ACTIVO E INACTIVO DE LOS RECEPTORES.....	49
4.6	MODELADO COMPUTACIONAL POR HOMOLOGÍA DE LOS GPCRS.....	50
4.6.10	<i>Asignación provisional de la estructura secundaria y selección de la plantilla</i>	50
4.6.11	<i>Alineamiento de las secuencias homologas</i>	51
4.6.12	<i>Modelando las zonas estructuralmente conservadas</i>	53
4.6.13	<i>Modelado de las zonas variables</i>	53
4.6.14	<i>Refinado del modelo</i>	53
4.6.15	<i>Validación del Modelo</i>	54
4.7	DISEÑO Y BÚSQUEDA DE FÁRMACOS RESULTANTES DE LOS ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LA RODOPSINA.....	54
4.8	HERRAMIENTAS Y RECURSOS LIBRES PARA EL ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN LIGANDO-GPCR.....	58
5	MODELADO POR HOMOLOGÍA DEL DOMINIO 7M DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DEL GLUTAMATO.....	60
5.1	INTRODUCCIÓN Y DE ARTÍCULOS DE BASE.....	60
5.2	DESCRIPCIÓN DEL ARTICULO DE MALHERBE. “MUTATIONAL ANALYSIS AND MOLECULAR MODELING OF THE ALLOSTERIC BINDING SITE OF A NOVEL, SELECTIVE, NONCOMPETITIVE ANTAGONIST OF THE METABOTROPIC GLUTAMATE 1 RECEPTOR”.....	61
5.3	CONSTRUYENDO UN MODELO DE HOMOLOGÍA DE mGLUR1 CON HOMMER.....	63
5.3.1	<i>El objetivo: Obtener un modelo activado y desactivado de mGLUR1</i>	63
5.3.2	<i>Comprobando la homología</i>	63
5.3.3	<i>Modelando la estructura con HOMMER</i>	66
5.3.4	<i>Visualizando los resultados</i>	66
5.3.5	<i>Comprobando la estructura con Swiss – Model</i>	68
5.3.6	<i>El objetivo: Comprobar el sitio de unión con docking molecular</i>	69
5.3.7	<i>Docking del ligando con ArgusLab</i>	69
5.4	DOCKING DEL LIGANDO CON MOLEGO.....	74
5.4.8	<i>Detección de las cavidades y preparación del docking</i>	74
5.4.9	<i>Poses de mGLUR1 activa</i>	75
5.4.10	<i>Poses de mGLUR1 inactiva</i>	75
5.4.11	<i>Discusión</i>	77
5.5	INTRODUCCIÓN A LOS REGULADORES ALOSTERICOS.....	78
5.6	DESCRIPCIÓN DEL ARTICULO DE YANAMALA. “PREFERENTIAL BINDING OF ALLOSTERIC MODULATORS TO ACTIVE AND INACTIVE CONFORMATIONAL STATES OF METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS.”.....	80
5.6.12	<i>Replanteando el problema</i>	81
5.6.13	<i>Resultados</i>	82
5.6.14	<i>Discusión y conclusiones</i>	82
6	MODELADO MOLECULAR DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA.....	85
6.1	INTRODUCCIÓN Y ARTÍCULOS DE BASE.....	85
6.1.1	<i>Enfoque de caso práctico</i>	85
6.1.2	<i>Importancia bioquímica del A3ARs</i>	88
6.1.3	<i>Modelado molecular de A3AR. Estado del arte</i>	88

6.1.4	<i>Estudio de los agonistas de A3AR. Description del articulo "Computer aided comparative analysis of the binding modes of the adenosine receptor agonists for all known subtypes of adenosine receptors"</i>	89
6.1.5	<i>Estudio de los antagonistas de A3AR. Description de los artículos de Wei y Colota sobre docking de triazopurinas, imidazopurinas pirrolopurinas, quinazolininas y arilpyrazoqnazolininas.</i>	91
6.2	REPLANTEANDO EL PROBLEMA, MATERIALES MÉTODOS Y OBJETIVOS.....	92
6.3	MODELADO DE LAS PROTEÍNAS EN ESTADO ACTIVO E INACTIVO.	93
6.3.6	<i>Revisión de las estructuras con Procheck</i>	93
6.3.7	<i>Comparación de las estructuras.</i>	95
6.4	PREPARANDO LA PROTEÍNA CON DOCKINGSERVER	97
6.4.8	<i>Selección del espacio de búsqueda.</i>	97
6.4.9	<i>Testeando la posición del ligando Adenosina en IOEA.</i>	98
6.4.10	<i>Optimización de la pose más favorable de la Adenosina con A3AR (IOEA).</i>	100
	<i>Metodo computacional con Docking Server:</i>	101
6.5	RESULTADOS DE DOCKING CON LIGANDOS AGONISTAS CON IOEA, COMPARACIÓN DE AUTODOCK. ARGUSLAB Y MOLEGRO.	103
6.6	RESULTADOS DE DOCKING CON LIGANDOS AGONISTAS CON IOEA, A3AR_2136 Y A3AR_2137..	106
6.7	RESULTADOS DE DOCKING CON LIGANDOS ANTAGONISTAS CON IOEA, A3AR_2136 Y A3AR_2137.	109
6.8	RESULTADOS DEL EXPERIMENTO DE SCREENING DE AGONISTAS DE A3AR (IOEA)CON MOLEGRO..	113
6.9	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	115
6.9.11	<i>Respecto a los objetivos iniciales de los casos.</i>	115
6.9.12	<i>Consideraciones adicionales.</i>	116
7	CONCLUSIONES FINALES	119
8	REFERENCIAS	121

Planificación del proyecto

Definición de objetivos, recursos para la realización del proyecto en el tiempo prefijado por el tutor de la UOC. .

1 Introducción

La organización del tiempo y los recursos disponibles es la clave para llevar a buen fin cualquier tipo de proyecto. El objetivo de la planificación del proyecto es determinar las tareas necesarias, y asignar los recursos disponibles, para finalizar con éxito los objetivos propuestos en el tiempo prefijado por el cliente.

Una buena planificación tiene que identificar y resolver cada uno de los siguientes ítems.

1. Cliente: Hay que definir quien es el “cliente” del proyecto. En un proyecto industrial es normalmente el “comprador” o el “Director industrial”. En un proyecto científico existen igualmente diferentes tipos de clientes. Por ejemplo, en un proyecto destinado a recibir una beca de investigación, el cliente final es el tribunal administrativo que lo evaluará y en consecuencia admitirá o denegará la beca. El mismo ejecutor del proyecto es cliente del mismo y parte interesada, lo que nos lleva a distinguir entre clientes directos e indirectos.
-

2. **Objetivos:** Los objetivos los suele determinar el cliente, pero siempre de forma vaga o indeterminada. Normalmente tendremos un “tema o ámbito” del proyecto y una enumeración de objetivos.
3. **Tiempo prefijado:** El cliente siempre exige un plazo de entrega del proyecto, y si no es así exige que la planificación o el ejecutor del proyecto fije uno.
4. **Recursos:** Los recursos están delimitados indirectamente por el cliente. Es decir un cliente encarga un proyecto y ofrece, o no, ofrece un dinero o una compensación por ello. Parece obvio, pero no lo es, “el cliente encarga un proyecto a alguien, ese alguien puede ser una persona, varias, un departamento, o una compañía. En todos los casos los recursos están delimitados por las personas que trabajarán en el proyecto, los medios temporales disponibles (disponibilidad) y los recursos materiales en forma de maquinaria y dinero para subcontrataciones.
5. **Tareas:** El ejecutor del proyecto tiene que delimitar las tareas necesarias para alcanzar los objetivos. Determinar exactamente los objetivos puede ser una de las tareas a realizar, esta parte del proyecto se denomina etapa de análisis. Después de una etapa de análisis es normal que se replanteen parte de la planificación de un proyecto. En ocasiones cuando se encarga un proyecto la definición de objetivos puede ser vaga o imprecisa, o no ajustada a los recursos delimitados por el cliente.
6. **Asignación de recursos a tareas.** Una vez definidas las tareas queda el trabajo de repartir los recursos disponibles entre las tareas a realizar. Para hacer la asignación hay que tener en cuenta el gasto de recursos de cada tarea y las relaciones temporales entre las mismas (cual va delante o detrás, o cual se puede realizar paralelamente). La asignación de tareas está delimitada por el plazo de entrega exigido por el cliente.

Una buena planificación resuelve muchas dudas al cliente y al ejecutor, y sobre todo evita malos entendidos y decepciones a la hora de determinar si se han cumplido los objetivos temporales y de calidad al finalizar la ejecución del proyecto. Si la planificación es correcta, el ejecutor del proyecto, fijará objetivos congruentes con los recursos disponibles, y en caso de comprobar que los recursos que dispone no son suficientes puede advertir al cliente para renegociarlos.

Una planificación es un documento vivo, y durante la ejecución tiene que ser revisado y adaptado. Es normal que la planificación original está basada en “hitos” o puntos de control en los que hay que revisar la planificación y readaptarla. En el caso de un proyecto científico como el nuestro, la incertidumbre de lo nuevo hace que esta revisión y adaptación continua sea más importante. Hay que tener en cuenta que durante la ejecución se puedan tomar distintos caminos, o incluso se puedan modificar o renegociar los objetivos originales.

Un proyecto no se debe sobreplanificar, pues dedicaríamos recursos valiosos para la ejecución del mismo. La planificación hay que adaptarla a las necesidades de ejecución del proyecto y a los requerimientos que nos imponga el cliente.

2 Definición del cliente del proyecto y los recursos

En este caso el proyecto está encargado por el tutor de la UOC para evaluar si somos capaces de desarrollar un tema científico en forma de documento, basándonos en un guión prefijado.

En nuestro caso el principal cliente es el tutor por delegación del Director del postgrado y en un entorno universitario avanzado. Otros clientes indirectos son **los posibles científicos que puedan leer nuestro documento final** y juzgar su validez dentro del ámbito académico y científico. Igualmente nuestro documento podrá ser leído por **alumnos de nuestro nivel** y por tanto también debe ir dirigido a ellos.

Como ejecutor del proyecto estoy especialmente interesado en su planificación y también soy un cliente indirecto del mismo.

Los recursos disponibles, **somos nosotros mismos** y el foro de la asignatura. Estamos limitados por **nuestros conocimientos previos sobre el tema**, por **la calidad de nuestro(s) ordenadores**, y por el **acceso a programas y fuentes de información** (bases de datos, revistas y libros) que pudieran ser de pago. En todo caso, disponemos del acceso a las fuentes de información que nos facilita la UOC a través de su biblioteca y de multitud de software libre que deberemos aprender a manejar.

3 Determinación de los objetivos del proyecto

Los objetivos y requerimientos de ejecución del proyecto se han entregado en forma de dos documentos:



La guía de estudio y el enunciado del proyecto. En el momento de redactar este epígrafe de planificación, se me ha asignado el tema del mismo por el tutor **“Estudio de las estructuras de receptores transmembrana: rodopsinas”**, y he realizado un breve estudio del tema para centrar los objetivos y tareas.

Como tarea previa a la planificación he resumido en las siguientes listas los objetivos y requerimientos “del cliente”.

3.1 La guía de estudio:

1. El objetivo principal especificado en la guía de estudio es crear un documento, eminentemente práctico, que versará sobre uno temas estudiados durante el postgrado. Los objetivos básicos de este documento son:
 - a. Poner en práctica e integrar los conocimientos y habilidades adquiridos en el curso
 - b. Profundizar en estos conocimientos y sus problemáticas a través del uso en situaciones reales
 - c. Desarrollar la iniciativa suficiente para guiar la búsqueda de resultados y la investigación de un caso real concreto
 - d. Situar el proyecto en un contexto bibliográfico
 - e. Aprender a interpretar los resultados, resolver problemas y plantear nuevas cuestiones

La guía de estudio **establece la estructura del resultado final de la ejecución del proyecto en forma de documento**. Esta debe tener la estructura de un “artículo científico” y nos da el esquema que tendrá el documento final:

1. Descripción del proyecto: planificación (tiempo estimado), tareas, objetivos y riesgos en su ejecución, evaluación.
2. Introducción (al problema biológico y al estado del arte)
3. Materiales y métodos (usados en el proyecto: secuencias, programas)
4. Resultados (del proyecto)
5. Discusión (de los resultados y de los materiales/metodos usados)

6. Bibliografía (no menos de 10 referencias, usadas durante el informe)

2. **El enunciado del proyecto:** Delimita el ámbito del proyecto y establece los requisitos mínimos, que en nuestro caso son:
- 10 referencias bibliográficas deben ser analizadas
 - Estudio de 3 ejemplos prácticos conocidos
 - Uso de las herramientas específicas (servidores WEB, bases de datos, ...)
 - Visualización y presentación de todas las estructuras con RASMOL

El enunciado concreto de nuestro proyecto dice así:

La predicción de estructura de las proteínas es un campo vasto y complejo debido precisamente a la gran variedad de éstas. En particular, las proteínas transmembrana han sido ampliamente estudiadas (no siempre con éxito) debido a su importancia biológica como elementos de filtro y comunicación de señales a ambos lados de la membrana celular. Los receptores acoplados a proteínas G, como las rodopsinas, son especialmente relevantes pues se relacionan con la percepción de la luz, el olor o las hormonas.

No es de extrañar que por ello, una gran proporción de medicamentos estén basados en combinaciones o alteraciones de estos receptores. Las rodopsinas son receptores de esta familia especializados en la recepción de luz (fotoreceptores). En este trabajo, el estudiante debe profundizar su investigación en estudiar la función y la relevancia de estas proteínas, las estructuras conocidas (p.e. rodopsina bovina), las bases de datos disponibles con información específica, y evaluar el funcionamiento de los programas de predicción de estructura sobre éstas.

Finalmente, es esencial saber relacionar todos estos aspectos con ejemplos prácticos de diseño de medicamentos que traten sobre éstas moléculas y documentar la relación entre los ligandos y los receptores, así como los experimentos de docking que hayan sido llevados a cabo exitosamente.

Objetivos:

- Importancia biológica de los receptores transmembrana
- Estudio de los G protein-coupled receptors
- GPCRDB: análisis de la base de datos
- Las rodopsinas (estudio de funciones y estructuras conocidas)
- Otro caso de estudio: receptores de adenosina
- Aplicación en diseño de fármacos de estas proteínas (casos documentados)

3.2 Reformulación de los objetivos del proyecto.

Para adaptar todo este conjunto de requerimientos y objetivos al tiempo disponible, se hace necesario **concretar y reformular los mismos teniendo en cuenta el tiempo y los recursos disponibles**. La reformulación que a continuación presento es **eminente práctica y tiene el objeto de centrar los temas y objetivos de cada parte del documento final**. A cada epígrafe de la estructura del proyecto (en

adelante cuando me refiera al proyecto me estará refiriendo implícitamente al documento final en si) le voy a asignar un contenido concreto que se ajustará a los objetivos especificados en el enunciado del proyecto. La preparación de los contenidos requerirá la realización de distintas tareas, que posteriormente enlazare en el epígrafe siguiente para darle un contenido temporal.

Los objetivos o contenido propuesto es una previsión, y puede que no coincida con el resultado final. La etapa de redacción del capítulo 2 (Introducción) marcará principalmente el contenido final de los capítulos 2, 3, 4 y 5.

<i>CAPITULOS</i>	<i>OBJETIVOS / CONTENIDO</i>	<i>TAREAS ASOCIADAS</i>
<p>CAPITULO 0 Descripción del proyecto: planificación (tiempo estimado), tareas, objetivos y riesgos en su ejecución, evaluación.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Redactar un documento de planificación del proyecto en donde: • Se establezcan con claridad los objetivos. • Definir el tiempo necesario para cada objetivo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Realizar una búsqueda bibliográfica básica. Y leer por encima para hacerse una idea general del proyecto • Redactar el documento de planificación
<p>CAPITULO 1 Introducción (al problema biológico y al estado del arte)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Proteínas de membrana, tipos, ejemplos de aplicaciones bioinformáticas. • G-protein-coupled receptors (GPCR), tipos, Bioquímica y funcionamiento básico. Estructura tridimensional. Interacción con los fármacos. Ejemplos de aplicaciones bioinformáticas – predicción de la estructura. • El caso particular de las rodopsinas. Estructuras disponibles, medios de estudio, homología, métodos de predicción de las estructuras y estado del arte. Interacción con la membrana y medios de simulación. Interacción con los fármacos, interés farmacológico. • Asociar y si es posible comparar los conocimientos sobre las rodopsinas con los receptores de adenosina. 	<ul style="list-style-type: none"> • Búsqueda bibliográfica en reviews y libros sobre GPCRs. • Extraer la información interesante e indexarla. • Crear un índice detallado(GCPRs). • Búsqueda bibliográfica detallada sobre rodopsina: Aplicaciones practicas y Casos de estudio interesantes • Crear un índice detallado (rodopsinas) • Búsqueda en bases de datos de las estructuras y representación con RASMOL. • Asociar todos los conceptos extraídos y redactar el capítulo.
<p>CAPITULO 2 Materiales y métodos (usados en el proyecto: secuencias, programas)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Relación de recursos específicos para el estudio de GPCRs • Relación de software utilizado y útil. • Análisis de la Base de datos GPRCDB 	<ul style="list-style-type: none"> • Buscar y Visitar las webs que puedan ser interesantes. • Hacer un catalogo de software y bases de datos) disponible consultado en Internet • Visitar y analizar la base de datos GPRCDB. • Redactar el capítulo (cap 2).

CAPITULOS	OBJETIVOS / CONTENIDO	TAREAS ASOCIADAS
CAPITULO 3 Resultados (del proyecto)	<ul style="list-style-type: none"> • Caso practico de interacción con fármacos 1 de rodopsinas. • Caso practico de interacción con fármacos 2 de rodopsinas. • Caso practico 3 de relación rodopsinas – otro GPRC y efectos sobre los fármacos. • (En los tres casos descripción y análisis de resultados) 	<ul style="list-style-type: none"> • Realizar los cálculos, y figuras necesarios de cada caso. • Redactar los resultados.
CAPITULO 4 Discusión (de los resultados y de los materiales/métodos usados)	<ul style="list-style-type: none"> • Conclusiones. • Perspectivas de Futuro 	<ul style="list-style-type: none"> • Reunificar y extraer conclusiones de los resultados y comparar con lo redactado en capítulo 1.
CAPITULO 5 Bibliografía (no menos de 10 referencias, usadas durante el informe)	<ul style="list-style-type: none"> • Relación de referencias utilizadas en el formato de publicación científica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar el listado definitivo de referencias. • Incluir las referencias en el texto escrito del proyecto.

Tabla 1 . Relación de objetivos / contenido para la ejecución del proyecto. En la mparte derecha se has especificado las tareas necesarias para completar el contenido especificado en cada caso.

4 Distribución de tiempos

Partiendo de las tareas establecidas en la Tabla 1 y usando el programa de planificación de proyectos Openproj (<http://sourceforge.net/projects/openproj/>) he distribuido el tiempo necesario estimado para completar cada tareaFigura 1.

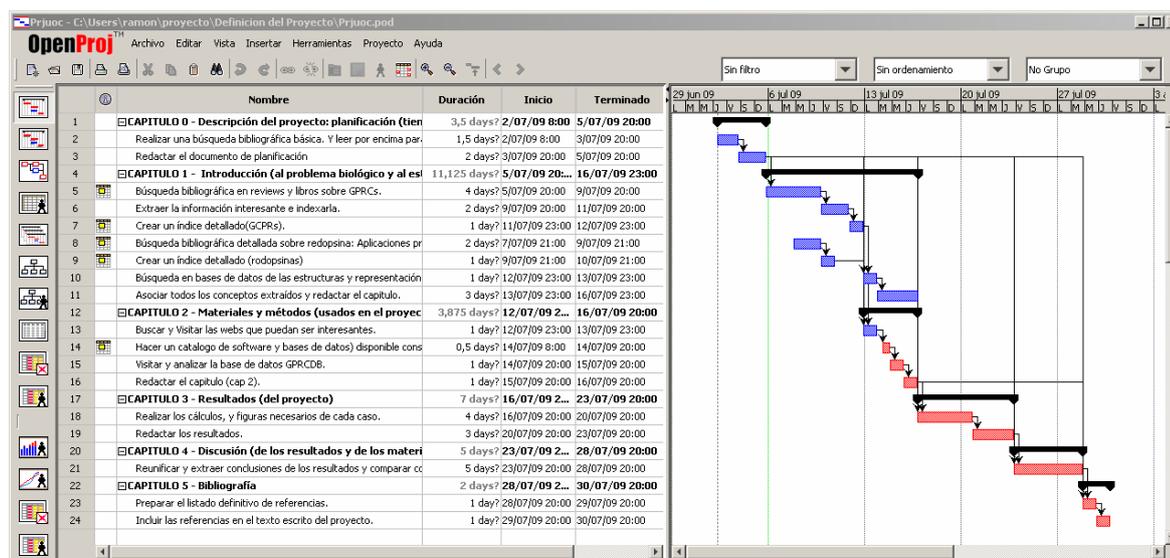


Figura 1. Imagen de la distribución de tiempos por tareas con Openproj (<http://sourceforge.net/projects/openproj/>).

Para crear la planificación temporal y la prioridad de tareas he tenido en cuenta la precedencia de tareas (tareas que para iniciarse necesitan que una tarea predecesora está finalizada), y las tareas que consumirán más recursos por ser más complicadas o laboriosas.

En líneas generales el proceso global del proyecto comenzará por una revisión general de la bibliografía a nivel de review y libros académicos, para redactar un guión sobre proteínas de membrana y GPRCs.. Este guión lo intentaré completar con las referencias más actuales que pueda encontrar en las principales revistas. Para evitar duplicidades elaboraré un esquema de contenido que me servirá en el momento de la redacción para añadir el texto comentado. El mismo proceso lo repetiré para el caso especial de la Rodopsina y los receptores de la adenosina. El capítulo 1 espero que quede completado sobre el día 15 de Julio.

Durante la revisión bibliográfica reuniré toda la información disponible sobre el software utilizado normalmente en este tipo de estudios y las bases de datos existentes. Intentaré seleccionar algún software sencillo que pueda ser empleado en el capítulo de “resultados”. La ejecución del capítulo 2 está asociada a la redacción del Capítulo 1.

Es muy importante que hasta el día 15 recopile toda la estructura, datos y software necesario para comenzar con éxito el Capítulo de resultados. En esta parte intentaré reproducir algunos de los resultados de los artículos que puedan ser asequibles al grado de conocimientos que haya alcanzado. Como es comprensible, en estos momentos del proyecto aun no tengo una idea detallada de los casos prácticos que presentaré en esta parte. Estimo que esta tarea me llevará hasta el 23 de Julio.

Por último, he reservado una semana entera para la discusión e inclusión de todas las referencias en el texto del documento. Este tiempo puede parecer excesivo, pero en realidad es un “colchón” por si sufro algún retraso en las etapas precedentes. Espero que el día 28 esté completamente finalizada la redacción del proyecto.

Los finales de las barras negras del gráfico de Gantt serán los puntos de control en donde revisaré si la planificación se está ajustando a las expectativas iniciales. Si encuentro desviaciones procederé a revisar la planificación. En todo caso si en alguna revisión realizo cambios apreciables a la planificación inicial incluiré la nueva como anexo.

5 Normas de redacción y contenido del proyecto.

Después de hacer una pequeña lectura de los reviews más actuales que he podido encontrar en estos primeros días he extraído algunas conclusiones que me van a ser de gran ayuda para no perderme en el universo de las proteínas de membrana.

En estos momentos el estudio de las rodopsinas y las GPCRs (G-protein-coupled-receptor) es un campo muy amplio, el grado de alta dificultad técnica y el nivel necesario para entender los artículos innovadores es muy exigente. Las técnicas experimentales que nos dan la información de partida son muy diversas e innovadoras (microscopía de campo molecular, mutación para sustitución de residuos, RX en estado sólido, etc.) y en muchos casos solo existe uno o dos ejemplos de aplicación “imposibles” de reproducir con garantías a nivel bioinformático.

Por todo ello en la redacción del Capítulo 1, elegiré únicamente varios reviews significativos, los resumiré, e intentaré completarlos con 10 o 12 artículos que considere realmente innovadores. Básicamente expondré en el texto las ideas principales y los detalles los remitiré a los artículos.

Los comentarios a los artículos seleccionados se podrán encontrar en el texto de una forma similar a como está construido en libro de Lodish (Molecular Cell Biology <http://bcs.whfreeman.com/lodish5e/>). Entiendo que

este no es un proyecto de “copiar y pegar” sino de demostrar que el autor entiende los contenidos y puede dar su punto de vista selectivo.

La selección de los casos prácticos es muy delicada y será un trabajo extraordinario que seguramente al redactar el documento final quede reflejado en dos o tres páginas de resultados. Respecto a los casos prácticos intentaré que no sean una repetición o casos aislados, sino que sigan un hilo conductor. De esta forma el proceso de discusión será mucho más fácil y congruente.

Realizada la planificación inicial, solo que comenzar|||||

The screenshot shows the 'Molecular Cell Biology' Fifth Edition website. The main content area displays a diagram titled 'Signaling at the Cell Surface : Second Messengers in Signaling Pathways'. The diagram illustrates a cell membrane separating the 'Exterior' from the 'Cytosol'. A 'Hormone' (represented by a purple sphere) is shown binding to a 'Receptor' (a green Y-shaped structure) embedded in the membrane. This interaction triggers the activation of 'PLC' (Phospholipase C), shown as a pink, irregular shape in the cytosol. Below the diagram, there are two options: 'Step-through' and 'Narrated'. The 'Step-through' option is selected, with a description: 'Select Step-through mode to view the animation as a series of discrete steps, each with a descriptive caption.' The 'Narrated' option is also described: 'Select Narrated mode to view the animation with audio narration.' The website footer includes 'W.H. Freeman & Co. | Biology | About This Book | Catalog | Order a Book | Contact Us | Tech Support | Privacy Policy'.

Figura 2.- Molecular Cell Biology <http://bcs.whfreeman.com/lodish5e/>

Introducción. Problema biológico y estado del arte

1 Introducción a las redes de señalización celular y receptores transmembrana.

1.1 Comunicación Celular

La **comunicación celular** es la capacidad que tienen todas las células de intercambiar información fisicoquímica con el medio ambiente y con otras células. La función principal de la comunicación celular es la de adaptarse a los cambios que existen en el medio que les rodea para sobrevivir a esos cambios, gracias al fenómeno de la homeostasis. (<http://es.wikipedia.org/wiki/Homeostasis>)

Ninguna célula vive aislada. **En todos los organismos multicelulares, donde se alcanza el grado más elevado de complejidad en la comunicación célula a célula, la supervivencia depende de una red compleja de comunicaciones intercelulares** que coordinan en las células su respuesta a los estímulos ambientales, crecimiento, diferenciación y metabolismo.

Para que esta supervivencia se dé, es necesario que las células:

- Se comuniquen con las células vecinas
- Vigilen las condiciones de su ambiente
- Respondan de manera apropiada a diversos tipos de estímulos que llegan a su superficie celular.

Las redes de señalización intracelular permiten el funcionamiento integrado de los sistemas moleculares. Estas redes procesan gran cantidad de información y son elemento indispensable en la comunicación intercelular. Los organismos pluricelulares se fundamentan en una elevada capacidad de relación y coordinación entre sus células. Las redes de señalización intracelular

integran las señales extracelulares e intracelulares elaborando de forma compleja respuestas adecuadas a cada estímulo.

Biochem J. 2005 December 1; 392(Pt 2): 249–261.

PMCID: PMC1316260

Published online 2005 November 22. doi: 10.1042/BJ20050908.

Copyright The Biochemical Society, London

Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway

Richard J. Orton,* Oliver E. Sturm,* Vladislav Vyshemirsky,* Muffy Calder,† David R. Gilbert,* and Walter Kolch^{‡§1}

*Bioinformatics Research Centre, Department of Computing Science, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, Scotland, U.K.

†Department of Computing Science, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, Scotland, U.K.

‡Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, Scotland, U.K.

§Beatson Institute for Cancer Research, Garscube Estate, Switchback Road, Bearsden, Glasgow G61 1BD, Scotland, U.K.

¹To whom correspondence should be addressed (email, wkolch@beatson.gla.ac.uk).

Received June 7, 2005; Revised July 19, 2005; Accepted July 28, 2005.

► This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

Figura 3.- Artículo de Orton en donde se realiza una simulación computacional re una red intracelular.

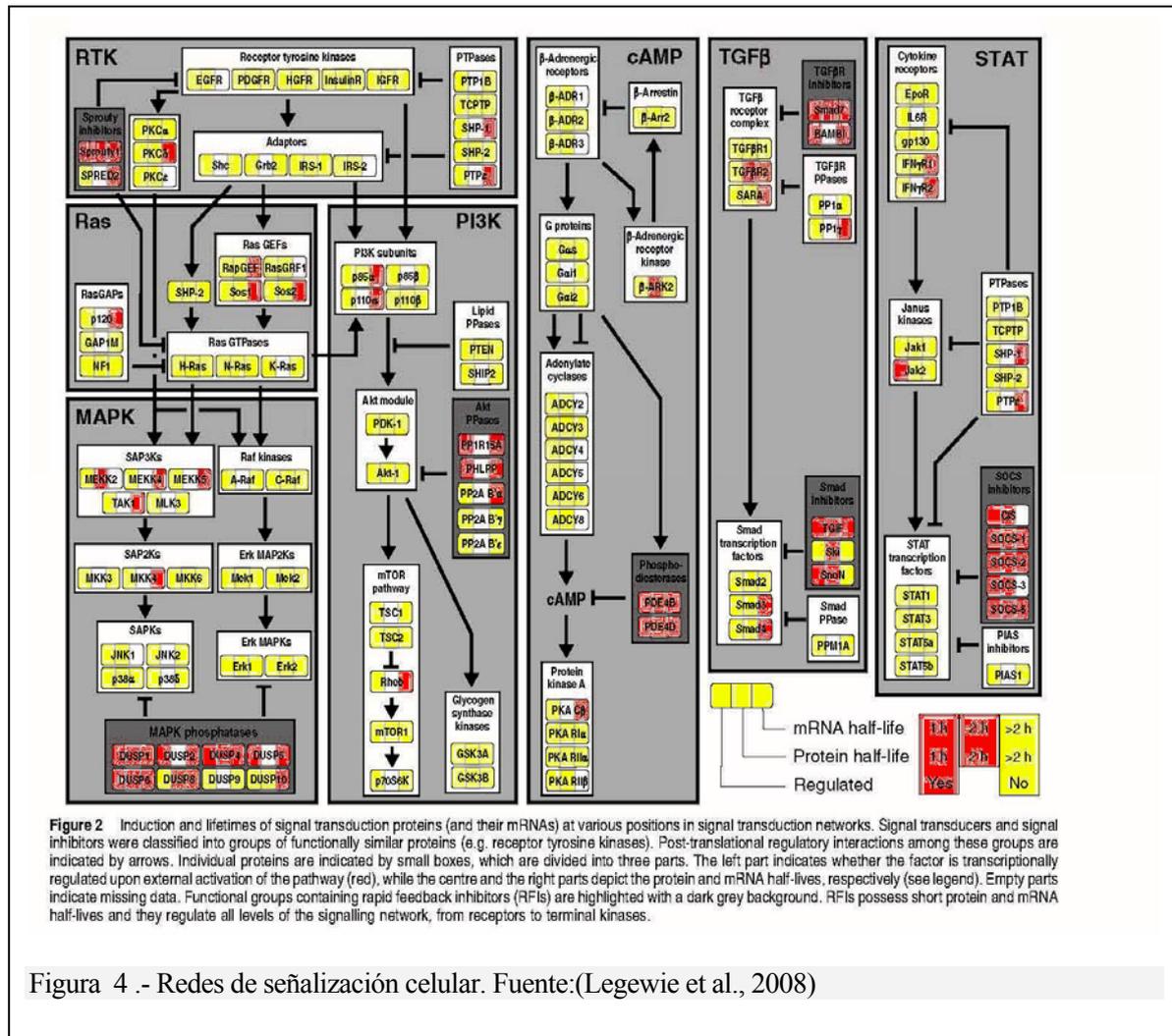
Fuente: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=1316260>

Las entradas de estas redes son los receptores que captan las señales del exterior y que suelen tener un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Estos receptores pueden unir moléculas específicas solubles, llamadas **ligandos**, o interactuar con otros receptores de membrana de otras células. En el artículo de (Legewie et al., 2008) hay un excelente resumen de las redes de señalización celular (Figura 4) aguzadas por familias.

Existen numerosos estudios que utilizan elementos de estas redes de señalización para comprender el desarrollo del cáncer y poder desarrollar agentes antitumorales. Por ejemplo, la ruta intracelular de Ras-Raf-MEK-ERK es común a muchas subredes de señalización que son activadas por factores de crecimiento que se unen a receptores tirosín-quinasa y estimulan la proliferación celular.

Los estudios basados en modelizaciones de las redes de señalización que integran la comunicación de información entre los distintos tipos celulares pueden ser muy útiles. Por ejemplo, el funcionamiento y coordinación de las células del sistema inmune se basa en el reconocimiento celular. **Este tipo de estudios puede aportar información clave para desarrollar nuevos tratamientos para enfermedades en las que el funcionamiento del sistema inmune está alterado.**

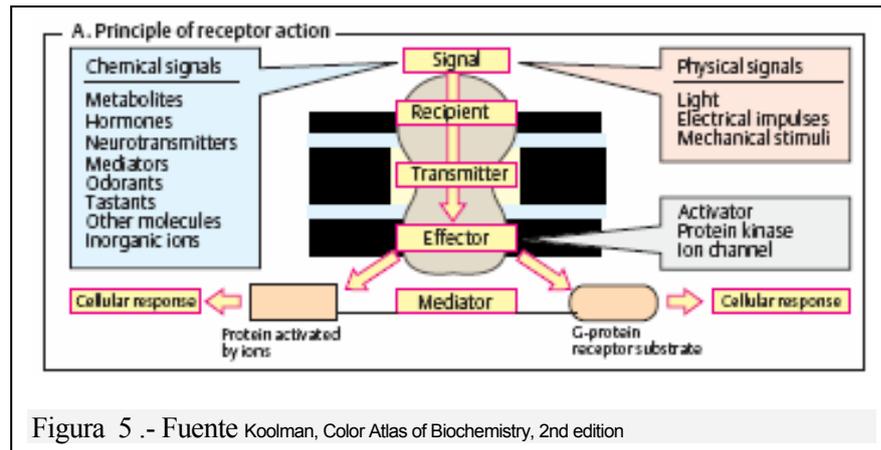
Para poder modelizar una red de señalización necesitamos información sobre los elementos que la componen y sus relaciones, como hemos visto interviene el medio, el “ligando”, el “receptor”



1.2 Los receptores de señal

El concepto de receptores es importante porque cuando se libera la sustancia para que se den estos tipos de comunicación **no se van a afectar a todas las células sino solo a aquellas que tengan el receptor necesario.**

Se define como receptor de señal ([http://es.wikipedia.org/wiki/Receptor celular](http://es.wikipedia.org/wiki/Receptor_celular)) a las proteínas que permiten la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular. Los receptores son proteínas o glicoproteínas presentes en la membrana plasmática, en las membranas de los orgánulos o en el citosol celular, a las que se unen específicamente otras sustancias químicas llamadas moléculas señalizadoras o ligandos, como las hormonas y los neurotransmisores. Todos los receptores sin importar si son de membrana o intracelulares cumplen dos características: son específicos y tienen que ser bastante afines a su ligando.



1.2.1 Características de los receptores:

-Mecanismos de señalización: todos los receptores están asociados de una a otra manera a mecanismos de señalización que llamaremos de transducción, es decir cuando una sustancia se une al receptor sucede algo, estos son **los segundos mensajeros** (sustancia que se genera por la estimulación del receptor por un primer mensajero). Los segundos mensajeros son intracelulares.

-Especificidad: un receptor es selectivo para un determinado tipo de ligando, pero **la especificidad no es del 100%, sino que también puede interactuar con sustancias parecidas, por lo que no hay exclusividad**. Todos los receptores sin importar si son de membrana o intracelulares cumplen dos características: son específicos y tienen que ser bastante afines a su ligando

-Redundancia: **un mismo ligando se puede unir a varios receptores y producir la cascada de amplificación**, redundancia porque sobre los receptores actúa un mismo ligando, siendo redundante el mismo ligando. O también puede ser redundante que varios receptores generen la misma respuesta (redundante la misma respuesta)

-Diversidad: un ligando **puede actuar sobre varios receptores y producir la cascada de amplificación**, aquí se aplica el concepto de diversidad porque el ligando puede actuar sobre varios receptores, es decir tiene diversidad para escoger sobre que receptor va a actuar.

1.3 Tipos de comunicación celular

1.3.2 Comunicación de organismos unicelulares

Las células unicelulares procariotas como las bacterias y las células eucariotas viven en un medio acuoso del que reciben múltiples estímulos fisicoquímicos como la luz, temperatura, salinidad, acidez, concentración de otras sustancias, a los que responden generalmente con movimiento, llamado taxia o tropismo <http://es.wikipedia.org/wiki/Taxia> (quimiotaxia, fototaxia, etc.). Los organismos unicelulares captan de su ambiente los estímulos y procesan la información que reciben a través de una vía de transducción de señales, que controlan por ejemplo la dirección del movimiento de sus pseudópodos, flagelos o cilios.

Estos organismos unicelulares también producen sustancias similares a las hormonas, que son captadas por individuos de su misma especie mediante receptores celulares específicos que se encuentran en la membrana. Muchas de estas sustancias son proteínas (proteínas de membrana) que tienen una secuencia de aminoácidos similar a la de organismos pluricelulares.

1.3.3 Comunicación intercelular en organismos multicelulares

Las proteínas receptoras celulares encargadas de recibir señales fisicoquímicas del exterior celular reciben las señales extracelulares por medio de los **ligandos**, uniéndose a ellas.

Existen tres tipos de comunicación celular según el ligando:

- Contacto celular con ligando soluble (hormona o factor de crecimiento).
- Contacto celular con ligando fijo en otra célula.
- Contacto celular con ligando fijo en la matriz extracelular.

1.3.4 Sistemas de comunicación celular

La existencia de organismos multicelulares, en los que cada una de las células individuales debe cumplir con sus actividades de acuerdo con los requerimientos del organismo como un todo, exige que las células posean un sistema de generación, transmisión, recepción y respuesta de una multitud de señales que las comuniquen e interrelacionen funcionalmente entre sí. Estas señales que permiten que unas células influyan en el comportamiento de otras son fundamentalmente químicas.

Hay varios tipos de comunicación entre las células; los más importantes son: la parácrina, la autócrina y la endócrina (http://es.wikipedia.org/wiki/Comunicaci%C3%B3n_celular).

1. Parácrina: se da entre 2 células muy cercanas entre sí. Es muy rápido, no necesita pasar al torrente sanguíneo.

2. Autócrina: se comunica consigo misma. Existen las internas, que es cuando no salen sustancias de sí misma, y las externas, que es cuando debe de liberar las sustancias para poder reconocerlas.

3. Endócrina: fue el primer tipo conocido, se descubrió con hormonas, porque las hormonas van a componer lo que se conoce como un sistema endocrino en el sistema de comunicación interna. Necesita del torrente sanguíneo y se da a largas distancias. Requiere de mayor tiempo de acción.

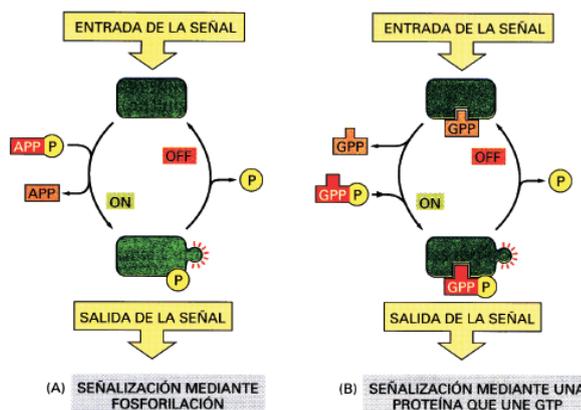


Figura 15-15 Los dos mecanismos principales de señalización intracelular comparten características comunes. En ambos casos una proteína señal es activada por la adición de un grupo fosfato, e inactivada por la eliminación del grupo fosfato. En (A) el fosfato es añadido de forma covalente a la proteína señal, mediante una proteína quinasa; en (B) una proteína señalizadora es inducida a cambiar su GDP por un GTP. Para poner de manifiesto las similitudes entre ambos mecanismos, el ATP se muestra como APPⓅ, el ADP como APP, el GTP como GPPⓅ y el GDP como GPP.

Figura 6.- Mecanismos principales de señalización celular.

El primer receptor de membrana fue el receptor nicotínico de acetilcolina y se llamó así porque es muy parecido al receptor de nicotina, ya que los receptores son llamados de acuerdo al ligando con el que fueron descubiertos. Este receptor nicotínico de acetilcolina pertenece a la familia de cuatro dominios transmembrana, los receptores de esta familia se caracterizan porque son canales iónicos.

1.4 Concepto de receptor farmacológico.

La gran mayoría de los fármacos cumplen su mecanismo de acción a través de la interacción con los receptores de señales intercelulares. Estas estructuras son moléculas, generalmente proteicas,

que se encuentran ubicadas en las células y que son estructuralmente específicas para un fármaco cuya estructura química sea similar o complementaria al mismo.

La molécula del fármaco que luego de los procesos de absorción y distribución llega al espacio intersticial tiene afinidad por estas macromoléculas receptoras y por ello se unen formando un complejo fármaco-receptor. Las uniones químicas de las drogas con el receptor son generalmente lábiles y reversibles. Mediante la combinación química de la droga con el receptor, este sufre una transformación configuracional que ya sea por sí misma o a través de una inducción de reacciones posteriores con la intervención de los llamados segundos mensajeros origina una respuesta funcional de la célula que es en definitiva el efecto farmacológico. A través del mecanismo mencionado el fármaco puede provocar efectos tales como: la contracción de un músculo liso o la relajación del mismo, el aumento o la inhibición de la secreción de una glándula, alteración de la permeabilidad de la membrana celular, apertura de un canal iónico o bloqueo del mismo, variaciones del metabolismo celular, activación de enzimas y proteínas intracelulares, inhibición de las mismas, etc.

1.5 Interacción del receptor con el fármaco

Hay dos parámetros fundamentales en la acción del fármaco con el receptor: la afinidad y la eficacia o actividad intrínseca.

La capacidad de unión o fijación del fármaco al receptor está determinada por la afinidad. En cambio la capacidad para producir **la acción fisio-farmacológica después de la fijación o unión del fármaco se expresa como eficacia** o actividad intrínseca.

Las sustancias endógenas y exógenas actúan por interacción con estructuras biológicas, modificando de alguna forma su función. Cuando como consecuencia de la unión del fármaco con el receptor se generan algunos de los mecanismos descriptos y se crea un estímulo se dice que **el fármaco posee afinidad y eficacia o actividad intrínseca.**

En este sentido, pueden afectar todo un sistema (acción inespecífica) o. La gran mayoría de los compuestos endógenos y exógenos **actúan interaccionando con un receptor con una estructura específica** para generar cambios selectivos, Para que se lleve a efecto dicha interacción debe haber una estrecha correlación químico estructural que posibilite la unión

Tanto la afinidad como la eficacia están determinadas por las propiedades moleculares del fármaco, pero en general las características estructurales químicas que determinan la eficacia o actividad intrínseca son diferentes de las que determinan la eficacia por el receptor. **Es por eso que un fármaco puede poseer afinidad pero carecer de actividad específica.**

La intensidad del efecto farmacológico se relaciona con varios factores:

- **Cuando mayor es el número de receptores ocupados por el fármaco mayor es la intensidad de la respuesta.** Sin embargo, generalmente existe en la célula un número disponible de receptores, mucho mayor para algunas fármacos la ocupación del 1-5% de los receptores disponibles ya determina una respuesta celular máxima.

- Otro factor que modifica la intensidad del efecto **puede ser la cinética de recambio de los receptores**. Como son de naturaleza proteica los receptores están en permanente producción o síntesis, ubicación en los sitios celulares, regulación y destrucción o biotransformación.

Aquel compuesto, que con relación a **un receptor posee afinidad y actividad intrínseca se le conoce como un agonista**.

Igualmente, aquellas sustancias que **impiden la acción del agonista reciben el nombre de antagonistas**, que pueden ser

- **Competitivos**: actuando en el mismo sitio receptor del agonista,
- **no competitivos** , actuando en receptores diferentes pero influenciando la actividad del ligando original y,
- **agonistas parciales** cuando poseen cierta eficacia, pero menor que la del agonista verdadero.

El conocimiento cada vez más íntimo de la acción de los agonista ha hecho posible descifrar la causa de algunas enfermedades y de diseñar nuevos fármacos más eficaces y selectivos que los medicamentos de partida..

1.6 Familias de receptores

Hay dos grandes familias de receptores que son:

- **Receptores intracelulares o nucleares**: son receptores que están en el citoplasma o adentro del núcleo pero la acción siempre va a ser dentro del núcleo.
- **Receptores de membrana**: Asociados a membranas celulares o las de las organelas, es decir algunos también están dentro de la célula, pero no son intracelulares o nucleares porque están asociados a una membrana siendo entonces receptores de membrana. **Todos los receptores de membrana son proteínas integrales y todos ellos son transmembrana.**

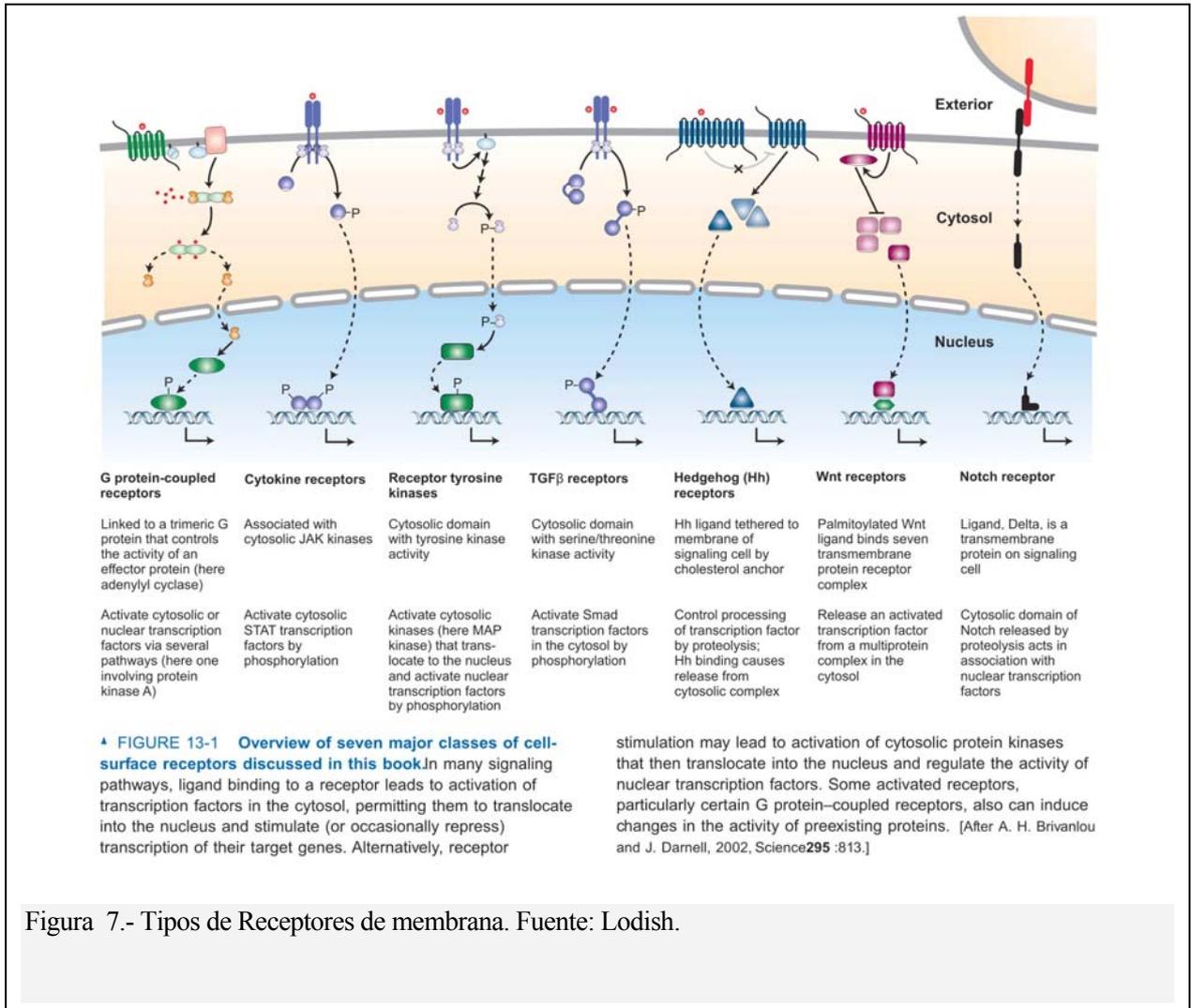


Figura 7.- Tipos de Receptores de membrana. Fuente: Lodish.

2 La membrana celular y los receptores transmembrana

2.1 La membrana celular.

Para llevar a cabo las reacciones químicas necesarias en el mantenimiento de la vida, la célula necesita mantener un medio interno apropiado. Esto es posible porque las células se encuentran separadas del mundo exterior por una membrana limitante, la **membrana plasmática** (http://es.wikipedia.org/wiki/Membrana_plasm%C3%A1tica). Además, la presencia de membranas internas en las células eucariotas proporciona compartimientos adicionales que limitan ambientes únicos en los que se llevan al cabo funciones altamente específicas, necesarias para la supervivencia celular..

La mayoría de las células tienen membranas internas además de la membrana plasmática que forman y delimitan espacios donde se llevan a cabo las actividades bioquímicas de la célula. Estas membranas constituyen además barreras selectivas para el paso de sustancias y tienen funciones específicas en cada caso. En el siguiente link hay una presentación excelente de las funciones de las membranas (<http://www.johnkyrk.com/cellmembrane.esp.html>).

Todas las membranas biológicas están constituidas principalmente por lípidos y proteínas. La mayor parte de ellas también poseen hidratos de carbono unidos a las proteínas y a los lípidos. La relación existente entre los lípidos y las proteínas de membrana suele variar dependiendo del tipo de membrana.

La bibliografía existente sobre las membranas biológicas es muy amplia, los libros de biología celular y molecular normalmente tienen varios capítulos que tratan el tema. En particular una completa introducción esta disponible en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=Structure,Membrane&rid=mboc4.chapter.1861>) el libro de Alberts a “Molecular Biology of The Cell”, a través del portal del NCBI.

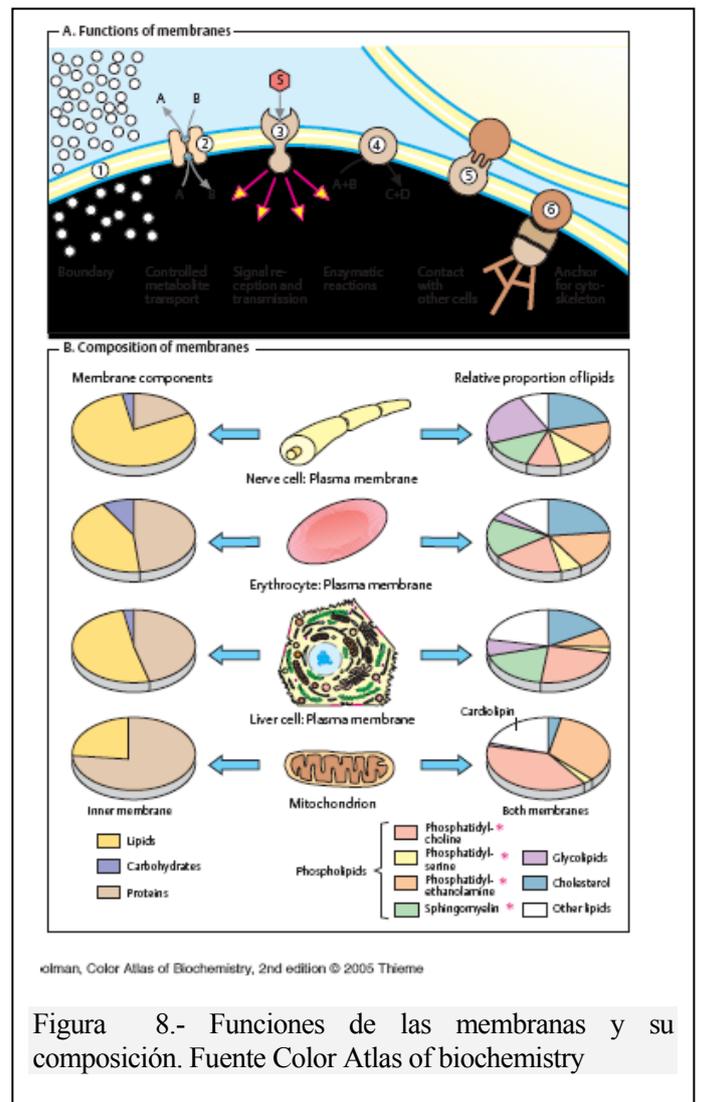


Figura 8.- Funciones de las membranas y su composición. Fuente Color Atlas of biochemistry

2.1.1 Funciones biológicas de las membranas

La membrana celular funciona como una barrera semipermeable, permitiendo el paso de pocas moléculas y manteniendo la mayor parte de los productos producidos dentro de ella. Las

membranas también funcionan como un puntos de anclaje para catalizadores enzimáticos. Y no hay que olvidar que permiten

- Regular el transporte desde y hacia la célula y de los dominios subcelulares
- Mantener acoplados a los receptores que reconocen señales de determinadas moléculas y y esta forma transducir la señal al citoplasma.
- Permitir el reconocimiento celular.
- Servir de sitio de fijación para la catálisis enzimática.
- Proveer de "puertas" que permitan el pasaje través de las membranas de diferentes células (gap junctions)
- Regular la fusión de la membrana con otra membrana por medio de uniones especializadas

Y además otras funciones vitales son: Direccional la motilidad celular, servir como envoltura de protección, ayudar a la compartimentalización subcelular y supracelular., proveer sitios de anclaje para los

2.1.2 Estructura de las membranas. El modelo del Mosaico Fluido

Las membranas biológicas son bicapas lipídicas. En una célula real los fosfolípidos de membrana

se disponen una bicapa lipídica y conforman espacialmente una estructura tridimensional esférica, que la rodea. Se representa, comúnmente en dos dimensiones como: Una bolita con dos extremidades (ver la figuras en la wikipedia

http://es.wikipedia.org/wiki/Bicapa_lip%C3%ADica)

Cada unidad representa un fosfolípido

(<http://es.wikipedia.org/wiki/Fosfol%C3%ADpido>). La bolita, o

cabeza, es un grupo fosfato cargado negativamente (y por tanto polar e hidrofílico) y las dos colas corresponden a las cadenas hidrocarbonadas (apolares, hidrofóbicas) de los ácidos grasos que esterifican al glicerol. Las colas hidrofóbicas se orientan una hacia la otra creando un área hidrofóbica dentro de la membrana. Esto deja los grupos fosfatos mirando hacia el

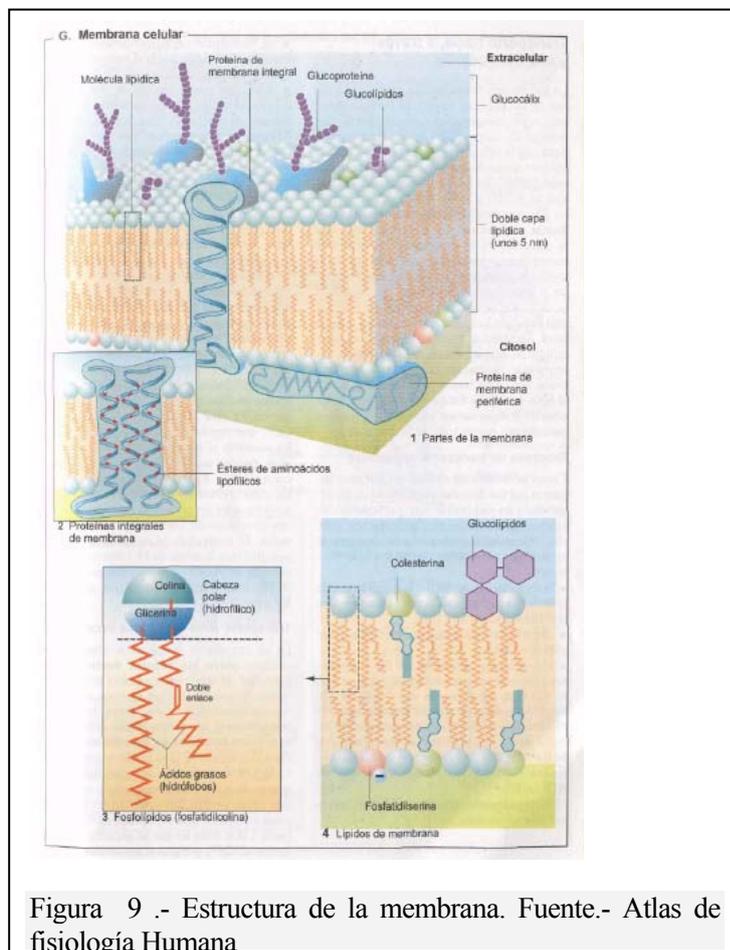


Figura 9 .- Estructura de la membrana. Fuente.- Atlas de fisiología Humana

exterior, que es hidrofílico. El espesor de una membrana es de aproximadamente 5 nm. (es variable según el tipo de membrana)

La bicapa lipídica es semipermeable, es decir que algunas moléculas difunden a través de ella. Es virtualmente impermeable a las grandes moléculas, relativamente impermeable a moléculas pequeñas como los iones cargados y muy permeables a las moléculas pequeñas liposolubles.

Hay que tener en cuenta que existen moléculas de colesterol "embebidas" en la membrana, el colesterol es un componente necesario de las membranas biológicas. El colesterol rompe las interacciones tipo Van der Waals entre las "colas" de los fosfolípidos. Esto hace que la membrana sea más fluida. Por lo tanto una manera de controlar la fluidez de la membrana es regulando el nivel de colesterol en la misma.

Otra manera en la cual la célula controla la fluidez de su membrana es regulando la proporción de la saturación (cantidad de dobles enlaces en las mismas, ver Figura 9) de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos ("colas") de los fosfolípidos.

Un grupo de fosfolípidos cuyos ácidos grasos son saturados pueden agruparse muy cerca unos de otro y formar numerosas uniones tipo Van der Waals que mantienen unidos a los fosfolípidos. Aquellos que tienen cadenas insaturadas rompen las uniones Van der Waals y los grupos al impedir que los fosfolípidos se acerquen.

2.2 Introducción a las proteínas transmembrana

Las **proteínas de membrana** representan el principal componente funcional de las membranas, como hemos visto desempeñan un papel fundamental en la regulación y también en el control de su permeabilidad. Las proteínas de membrana pueden clasificarse, utilizando como criterio el grado de asociación a esta, en "integrales" y "periféricas".

- Las **proteínas integrales** están firmemente unidas a la membrana y sólo se pueden liberar por la acción de agentes que interfieren en las interacciones hidrofóbicas tales como detergentes, disolventes orgánicos o desnaturizantes. Es así como, las proteínas integrales toman contacto tanto con el lado exterior, como con el interior de la membrana. Por lo tanto se dice también que estas proteínas son de transmembrana. Casi en forma invariable estas proteínas se encuentran asociadas con hidratos de carbono, por lo cual se las denomina como Glucoproteínas, las cuales representan más de un 70 % del total de las proteínas de membrana.
- Las **proteínas periféricas** se asocian con la membrana a través de interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno con los dominios hidrofílicos de las proteínas integrales y con los grupos de las cabezas polares de los lípidos de membrana. Las proteínas periféricas de la membrana no penetran en el interior hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica, asociándose con la bicapa mediante interacciones débiles (generalmente lo hacen mediante uniones del tipo iónicas).
- filamentos del citoesqueleto o los componentes de la matriz extracelular.

La identificación directa del número de proteínas de membrana existentes utilizando técnicas de proteómica es difícil, y hasta el momento estos estudios han proporcionado sólo inventarios superficiales. Sin embargo, las α -hélices de las proteínas de membrana son bastante fáciles de

identificar por medios computacionales, y los programas existentes pueden hacer una buena predicción. Los estudios computacionales están de acuerdo en que entre 20% y el 30% de todos los genes codifican paquetes de hélices de proteínas de la membrana (von, 2007).

2.3 Tipos de proteínas transmembrana según su estructura

Las proteínas transmembrana son proteínas que contienen uno o más fragmentos que atraviesan la membrana celular. Son proteínas especialmente importantes ya que participan en la comunicación de señales entre los espacios extracelular e intracelular y son clave en el establecimiento de las interacciones intercelulares.

Existen muchos tipos de proteínas transmembrana en función del número de veces que atraviesen la membrana, las que atraviesan la membrana una sola vez se denominan proteína transmembrana de paso único y las que atraviesan la membrana numerosas veces se llaman proteínas transmembrana multipaso.

Las zonas que atraviesan la membrana tienen los siguientes dominios.

1. En primer lugar una zona que pasa a través de la membrana, de características hidrofóbicas para interactuar con los lípidos de la bicapa lipídica (membrana celular).
2. Además, un dominio citosólico en contacto con el interior y de carácter hidrofóbico
3. y otro extra-citosólico en contacto exterior de la célula, de carácter hidrofílico. El resultado es una proteína anfipática.

2.4 Transmembrana unipaso

Son las proteínas que atraviesan la membrana una sola vez. El extremo N-Terminal de la proteína queda a un lado de la membrana, y el extremo C-Terminal al otro.

Los dominios de estas proteínas se caracterizan por:

- **Dominios transmembrana:** Presenta una estructura secundaria en α -hélice, con una longitud de unos 20 a 30 aminoácidos. Los residuos laterales han de ser en su mayoría hidrofóbicos, como alanina, leucina, isoleucina, etc. para poder interactuar con el interior de la bicapa por fuerzas hidrofóbicas y de Van der Waals. Es importante señalar que el interior de la hélice está ocupado, y no sirve como canal. **En los extremos de la hélice, pueden estar residuos con carga, que interactúan con la cabeza polar de los fosfolípidos de la bicapa.**
- **Dominios no transmembrana:** Son generalmente hidrofílicos y globulares, de longitud variable, que se mantienen mediante enlaces de hidrógeno y fuerzas electrostáticas. **En el dominio extracitosólico pueden presentarse enlaces disulfuro -S-S- y cadenas de oligosacáridos,** cosa que no ocurre en el dominio citosólico.

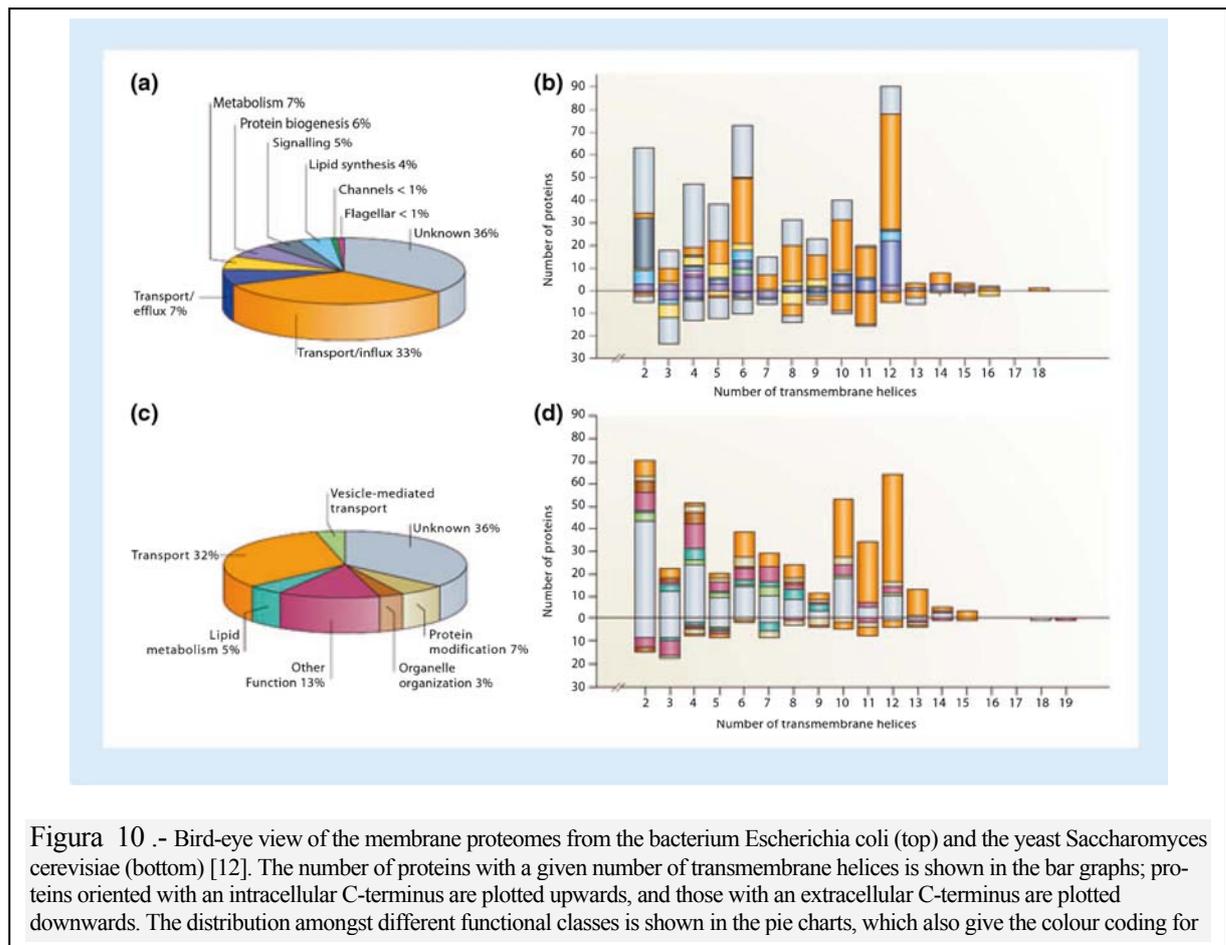


Figura 10.- Bird-eye view of the membrane proteomes from the bacterium *Escherichia coli* (top) and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (bottom) [12]. The number of proteins with a given number of transmembrane helices is shown in the bar graphs; proteins oriented with an intracellular C-terminus are plotted upwards, and those with an extracellular C-terminus are plotted downwards. The distribution amongst different functional classes is shown in the pie charts, which also give the colour coding for

2.5 Transmembrana multipaso

Atraviesan la bicapa lipídica en dos o más ocasiones, normalmente mediante varias α -hélice, aunque hay casos de inserciones a través de β -lámina.

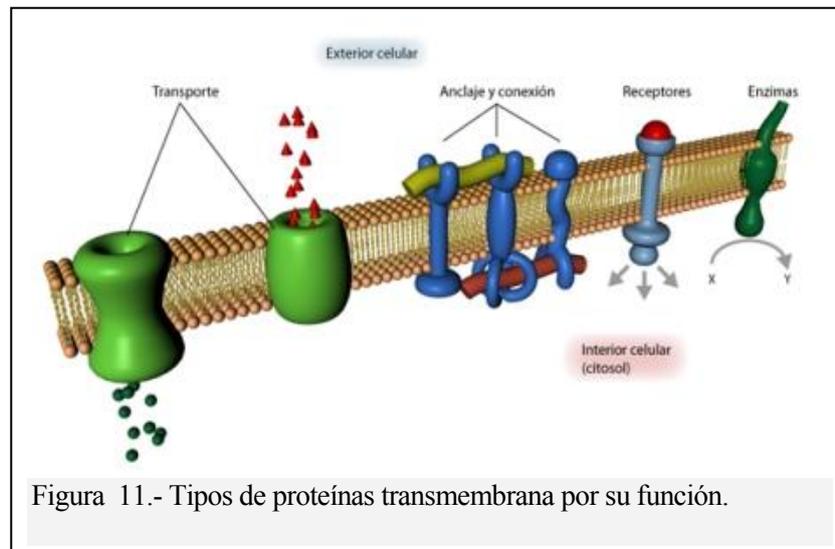
- Multipaso en α -hélice:** Estas proteínas tienen tantas α -hélices como veces atraviesan la membrana. Estas hélices se unen mediante bucles en sus dominios citosólico y extracitosólico (“loops”). Las α -hélices pueden servir únicamente como mero medio de anclaje a la bicapa, o pueden formar un canal por el que puedan pasar diversas sustancias. **En este último caso, las hélices tienen residuos hidrofóbicos que dan por fuera del canal, para interactuar con la bicapa; mientras que los residuos que dan hacia el canal interno son hidrofílicos.** De esta forma, muchas sustancias polares que en ausencia de proteínas no podían cruzar la membrana, ahora sí pueden hacerlo. Para poder formar un canal iónico, se necesita un mínimo de 5 α -hélices.

Las α -hélice pueden desplazarse, resbalando unas sobre otras, para producir un cambio conformacional. Esto sirve para regular la abertura de canales, transportar compuestos por permeasas y para la transducción de señales como en el caso de la **Rodopsina**.

- Multipaso en β -lámina:** Mucho menos frecuentes son los casos de proteínas transmembrana multipaso en β -lámina. Ejemplos se dan en cloroplastos, mitocondrias y bacterias. La β -lámina sólo requiere unos 10 aminoácidos para atravesar la bicapa. Existen proteínas con un número de β -lámina desde 8 a 22.

2.6 Funciones generales de las proteínas transmembrana.

En todas las membranas celulares hay proteínas transmembrana específicas que desempeñan actividades propias de la membrana en la que se encuentran. Por ejemplo, gran cantidad de reacciones enzimáticas que se llevan a cabo exclusivamente en el retículo endoplasmático son realizadas por proteínas transmembrana específicas del retículo y el cambio de pH que se produce en el interior de los lisosomas en los procesos de digestión intracelular se debe a la presencia de canales iónicos específicos para protones formados por proteínas transmembrana. Desde un punto de vista biomédico muchas proteínas transmembrana localizadas en la membrana plasmática son receptores implicados en la comunicación celular y en la señalización intracelular. Los receptores empleados por muchos virus para adentrarse en la célula suelen ser proteínas transmembrana y los canales iónicos responsables de la transmisión del impulso nervioso también son proteínas transmembrana.



Generalmente las proteínas transmembrana localizadas en la membrana plasmática se encuentran asociadas con otras proteínas de membrana, transmembrana o no, formando complejos supramoleculares que desempeñan una función. Estos grupos funcionales se localizan en unas zonas especiales de la membrana plasmática que reciben el nombre de “lipid rafts” o balsas lipídicas.

Las proteínas transmembrana desempeñan un papel clave como sensores y transmisores de señales, como formadoras de canales iónicos y como componentes específicos de complejos supramoleculares involucrados en funciones complejas (Muller et al., 2008).

El review de (Muller et al., 2008) establece cuatro funciones de importancia para las proteínas de membrana, aparte de la función estructural:

1. Transporte (electrolitos, agua, nutrientes, cofactores eliminación de sustancias tóxicas, etc)
2. reconocimiento molecular (anclaje y conexión de anticuerpos del sistema inmunitario),
3. receptores de señales, (visión, olfato, gusto, conducción eléctrica, etc),
4. transductores energéticos (enzimas)

2.7 Familias funcionales de los receptores transmembrana

Los receptores transmembrana se pueden clasificar según el mecanismo de su función proteica y número de dominios intermembrana como:

(Fuente: <http://www.scq.ubc.ca/cell-surface-receptors-a-biological-conduit-for-information-transfer/>)

2.7.3 Receptores ligados a enzimas. 1 dominio transmembrana:

El receptor tiene capacidad enzimática, pero la acción enzimática no es sobre su ligando porque el ligando se une extracelularmente, mientras que la función enzimática es intracelular.

El estudio de los diversos factores de crecimiento (proteínas de señales extracelulares que regulan el crecimiento) dio una luz sobre los receptores ligados a enzima-ligado, cuando se descubrió que se utilizaban estos receptores. Las respuestas a los factores de crecimiento son generalmente mucho más lentas (del orden de horas) que las respuestas relacionadas con las otras dos familias de receptores de superficie celular. Las Enzimas ligadas a los receptores de la membrana que abarcan sólo una un grupo.

La cara interna del receptor actúa como una enzima, que se activa cuando los ligandos se unen a la parte externa del receptor. La mayor clase de los receptores de esta familia de proteínas actúan como tirosina quinasas http://en.wikipedia.org/wiki/Receptor_tyrosine_kinase, que fosforilan una cadena de residuos de tirosina en determinadas proteínas intracelulares. Su función es muy simple: La unión de una señal o ligando a la parte exterior hace que la membrana que se dispare el proceso en la cara interna de la membrana.

2.7.4 Receptores tipo Canal. Con 4 dominios transmembrana.

Fuente: http://en.wikipedia.org/wiki/Ligand-gated_ion_channel

Estos receptores son de acción rápida. Actúan por ejemplo en el sistema nervioso con tiempos de transmisión muy pequeños (fracciones de milisegundos) a través de las sinapsis, en. Las Señales químicas que llegan a los receptores en forma de neurotransmisores, se transducen en una señal eléctrica en forma de una diferencia de tensión a través de la membrana plasmática.

Cuando un neurotransmisor se une a este tipo de receptor, se altera su conformación para abrir o cerrar un canal (a menudo a través de/o cerca de la del receptor) para el flujo de iones Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^- a través de la membrana. Impulsado por su gradiente electroquímico (es decir, uno de los lados de la membrana tiene numerosos iones, mientras que la otra parte tiene pocos) los iones fluyen hacia dentro o fuera de la célula, creando un cambio en el potencial de membrana, debido a la naturaleza positiva o negativa de los iones. Este flujo de iones a través del canal son los que desencadenan el impulso nervioso.

Algunos ejemplos de receptores tipo canal son:

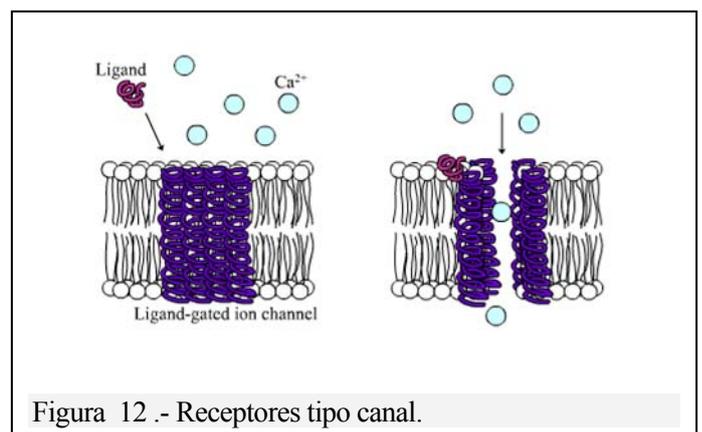
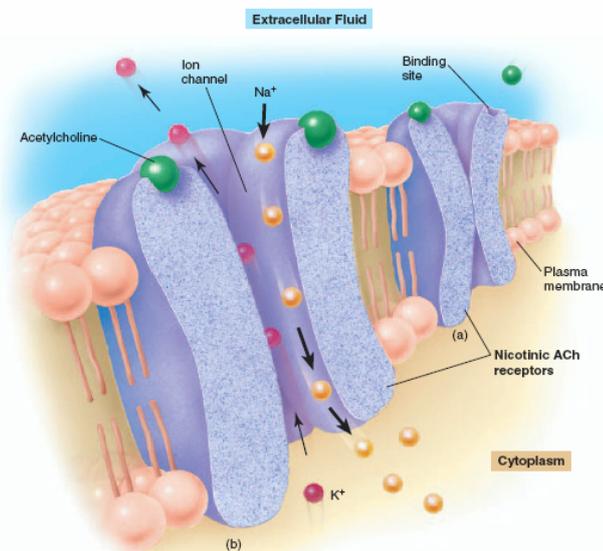


Figura 12.- Receptores tipo canal.

1. Canal nicotínico de acetilcolina: Es el prototipo de los receptores asociados a canales iónicos. Normalmente se encuentran en el músculo esquelético. Es un pentámero (cada uno con cuatro dominios transmembrana) con dos sitios de unión para el ligando. A través de este canal pasa Na^+ , cuando pasa la membrana se despolariza produciendo liberación de calcio y con esto la contracción del músculo esquelético. Fueron descubiertos en el pez torpedo. Inhibidores de este canal: Tubocurina, cobroxina y bungarotoxina..



■ **Figure 7.23** Nicotinic acetylcholine (ACh) receptors also function as ion channels. The nicotinic acetylcholine receptor contains a channel that is closed (a) until the receptor binds to ACh. (b) Na^+ and K^+ diffuse simultaneously, and in opposite directions, through the open ion channel. The electrochemical gradient for Na^+ is greater than for K^+ , so that the effect of the inward diffusion of Na^+ predominates, resulting in a depolarization known as an excitatory postsynaptic potential (EPSP).

Figura 13.- Fuente: Text book of human physiology

2. Receptor para el glutamato: El canal más estudiado para el glutamato es el de N-metil-D-aspartato (NMDA). Tiene 5 subunidades de 4 dominios transmembrana; canal para entrada del Ca. El NMDA es el único que tiene que ser coactivado ya que necesita además de Glu a la Gly (coactivador) para que se pueda dar la entrada del Ca, pero aun así se encuentra un tapón de de Mg para esto se encuentra asociado a otro receptor de glutamato que se llama AMPA, el cual mete Na el cual despolariza la membrana de provocando que se retire el tapón de Mg y se pueda meter el Ca. Es un receptor que esta relacionado con el proceso del aprendizaje. Fuente (http://en.wikipedia.org/wiki/Glutamate_receptor)
3. Receptor GABA_A : Es el receptor del ácido gama amino butírico (Es GABA_A porque hay un GABA_B que es de 7 dominios transmembrana) El GABA_A tiene 5 subunidades con 4 dominios cada una. Es el principal receptor inhibitorio del sistema nervioso disminuyendo la velocidad de disparo de las neuronas, esto porque el cloruro entra a favor de gradiente de concentración e hiperpolariza la membrana, por lo que será muy difícil activar un impulso nervioso. Este canal es muy importante en anestésicos, puede unirse a barbitúricos, esteroides, picrotoxina y benzodiazepinas (todos estos favorecen la apertura del canal es decir favorecen la hiperpolarización de la membrana. http://en.wikipedia.org/wiki/GABAA_receptor)

2.7.5 Receptores asociados a proteínas G . 7 dominios transmembrana:

Normalmente se los conoce y denomina por GPCR (G-Protein-Coupled-Receptors) **Es familia de receptores con más miembros identificados, y por supuesto la más estudiada y el objeto de**

estudio final de este trabajo. Igualmente grande es la diversidad de señales químicas que actúan a través de los GPCR. Algunos neurotransmisores que se unen a canales de iones también se unen a GPCRs (aunque en una forma mucho más lenta). **A pesar de la diversidad de los ligandos que se unen a ellos, todos los GPCRs estudiados hasta la fecha consisten en una única cadena polipeptídica con siete dominios transmembrana.** La unión de un ligando a este tipo de receptor se traduce en el “activado” de una proteína-G en la parte interna de la proteína. Una vez activada, esta proteína G-inicia un proceso que altera el comportamiento celular. http://en.wikipedia.org/wiki/G_protein-coupled_receptor

Los fotorreceptores de los ojos, así como los olfativos en la nariz de vertebrados, son miembros de esta familia. Se trata de una antigua proteína en términos de evolución, y se ha encontrado en los organismos que van desde los seres humanos a la levadura. Hay proteínas estructuralmente similares incluso en las bacterias, tales como la bacteriorhodopsin.

2.8 Importancia farmacológica de las proteínas de membrana

Al igual que las demás partes de una célula, el mal funcionamiento de las proteínas de membrana puede causar una amplia gama de enfermedades. No es este el lugar para examinar en detalle este tipo de enfermedades, pero veamos sólo unos pocos ejemplos genéricos (la lista podría ser interminable).

- Enfermedades neurológicas y cardíacas provocadas por defectos en los canales iónicos,
- ceguera o insensibilidad a colores es causada por fotorreceptores (rodopsinas) no funcionales,
- Las acuaporinas son fundamentales no sólo en el riñón, sino también en, por ejemplo, en el control de los accidentes cerebro vasculares.
- la fibrosis quística es causada por mutaciones en el plegado de la proteína CFTR, un transportador de cloruro en el pulmón.
- Por último, en las mutaciones de las proteínas de membrana de orgánulos como las mitocondrias y peroxisomas subyacen muchos de los graves trastornos hereditarios [35].

Una de las razones del reciente aumento de la investigación en las proteínas de membrana es su importancia para la industria farmacéutica. Según estimaciones recientes, **el 30% de los blancos farmacológicos de pequeñas moléculas que existen actualmente en el mercado son de GPCRs (G-Protein-Coupled-Receptors), el 7% son los canales iónicos, el 4% son moléculas de transporte, y otros receptores de superficie celular y proteínas son el 5 %.** Igualmente, muchas quinasas y fosfatasas son también blancos farmacológicos (también son proteínas de membrana). En suma, **más de la mitad de los objetivos de los fármacos actuales son proteínas de membrana.**

Las proteínas de la membrana son también importantes en nuevos desarrollos de fármacos (antibióticos) contra bacterias resistentes. Una forma de atacar a las bacterias resistentes es bloquear o inhibir los canales de comunicación celular de las bacterias basados en beta-proteínas tipo barril.

3 Biofísica de las proteínas de membrana. Interacciones con la membrana.

(Muller et al., 2008; Skach, 2009; von, 2007)

La biología estructural ha centrado los esfuerzos de investigación en las proteínas de membrana de importancia médica. Esto no significa que los biólogos estructurales de proteínas humanas las hayan elegido como objetivos únicos, sino que el enfoque común ha sido la de trabajar en homólogos bacterianos de proteínas humanas. **La finalidad última de estos estudios experimentales se ha centrado en determinar la estructura por cristalografía de rayos X o por otras técnicas como RMN o Microscopia.** El procedimiento experimental normalmente comienza con una serie de proteínas homólogas de una serie de diferentes bacterias para después, mediante técnicas de biología molecular se expresan estas en *E. coli*, y luego purificar las que mejor se expresan y tienen un comportamiento bioquímico “tratable”. Por último, se realizan los ensayos de screening de cristalización con un número elevado de variables (elección de detergente, el pH, la precipitación, los aditivos, etc) a menudo necesitan una gran cantidad de experimentos con el fin de encontrar buenos cristales.

A pesar de este proceso muy engoroso, las estructuras tridimensionales de muchas proteínas de la membrana se conocen ahora con resolución atómica.

The image shows a screenshot of a website titled "Membrane and Protein Biophysics Resources". It features three main sections on the left: "Membrane Proteins of Known 3D Structure", "MPtopo" (a curated database of membrane proteins), and "Membrane Protein Explorer (MPEX)". On the right, there is a detailed view of the "TOPDB: Topology Database of Transmembrane Proteins" website, including an "About TOPDB" section and a description of the database's content and search capabilities.

figura 14.- Bases de datos : <http://blanco.biomol.uci.edu/index.shtml> y <http://topdb.enzim.hu/?m=home&mid=0>

La base de datos “The Membrane Protein Data Bank” en paralelo con PDB, contiene enlaces y utilidades diversas en relación con las proteínas de membrana con estructuras resueltas <http://www.mpdb.ul.ie/index.asp>, En la actualidad tiene 956 entradas. Desde 2008 esta disponible la base de datos TOPDB (<http://topdb.enzim.hu/?m=home&mid=0>) de topologías, especializada en las proteínas de membrana. En la actualidad tiene 1497 entradas. Otra de las más importantes bases de datos con abundante información es la MPtopo (<http://blanco.biomol.uci.edu/index.shtml>).

El principal problema de la técnica de RX es la cristalización. Como hemos visto, las proteínas de membrana para ser aisladas necesitan ser desplazadas de su medio mediante detergentes. Este hecho implica que se tienen que buscar técnicas alternativas para elucidar su estructura tridimensional.

En el review de (Muller et al., 2008) y se detallan los métodos alternativos existentes. Como alternativas eficaces se están empleando técnicas avanzadas de RMN (resonancia magnética nuclear) en estado sólido o en micelas (<http://en.wikipedia.org/wiki/Micelle>) a efectos de simular el ambiente natural de la proteína, y sobre todo, microscopía electrónica de fuerza atómica.

La justificación de emplear métodos experimentales alternativos no reside únicamente en las dificultades de cristalización. Como explicamos, las proteínas de membrana están incrustadas dentro de la bicapa lipídica y su modelo tridimensional (y sobre todo su simulación) en muchos casos este es un factor determinante de su funcionamiento y estructura nativa.

Los factores a tener en cuenta al estudiar las proteínas de membrana son:

3.1 Naturaleza dinámica de las proteínas de membrana

Las proteínas de membrana tienen una naturaleza dinámica. Un experimento de RX únicamente nos va a tomar una instantánea de su dinámica molecular. La naturaleza dinámica contribuye a la entropía conformacional y a modular las funciones alostéricas de algunas proteínas de membrana. Los experimentos de RMN en rodopsinas (Werner et al., 2007) han demostrado la naturaleza dinámica y los efectos alostéricos. Este hecho ha sido también demostrado usando técnicas de simulación molecular de membranas.

La flexibilidad inherente de las proteínas, permite cambios conformacionales que pueden inducirse mediante, unión a un ligando, reacciones químicas (fosforilación), absorción de luz (caso de las rodopsinas), o cambios en el Ph del medio. Está perfectamente establecido por ejemplo que la absorción de luz por la Rodopsina está influenciada por el Ph del medio y por las posibilidades que le ofrece el entorno (la bicapa lipídica) para modificar su conformación terciaria.

3.2 Inserción de cargas en el interior de la proteína de membrana.

No solo se pueden acumular cargas eléctricas netas en las proteínas que forman canales iónicos, sino también algunas cargas netas debidas a reacciones químicas son vitales para que la proteína desarrolle su función. Un ejemplo interesante el papel de las cargas en los residuos Lys296 en la rodopsina bobina. Este residuo está situado en el centro de la molécula en la hélice transmembrana 7 (TM7) y está unido de forma covalente a al cromóforo mediante una base de schiff (http://en.wikipedia.org/wiki/Schiff_base). Un residuo cercano cargado negativamente contribuye a la formación de esta base, y por tanto a la formación y estabilización de la molécula en su estado funcional (Milligan, 2007; Palczewski, 2006).

3.3 El modulador de las función proteicas por los lípidos y fosfolípidos.

Irremediamente las proteínas de membrana están rodeadas de lípidos, y por tanto las propiedades físicas y químicas de ambos van a estar afectadas por este entorno. En el review de Muller (Fotiadis et al., 2004; Muller et al., 2008) se pone de manifiesto este hecho, no solo la estructura de las proteínas está afectada por los lípidos sino también la ordenación de los mismos en la cadena está influida por la presencia de proteínas. Tanto es así, que algunas estructuras cristalinas de bacteria-rodopsinas, mantienen incluso cristalizadas a algunos lípidos en la estructura.

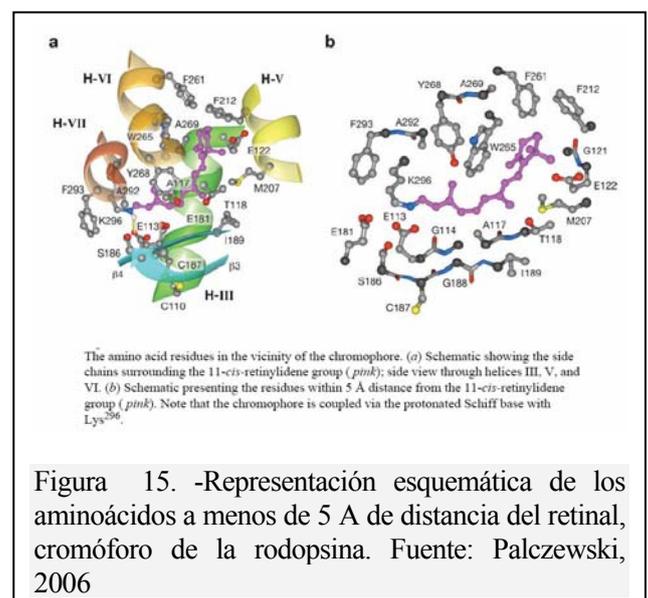


Figura 15. -Representación esquemática de los aminoácidos a menos de 5 Å de distancia del retinal, cromóforo de la rodopsina. Fuente: Palczewski, 2006

Algunos estudios de la rodopsina han mostrado que la transición de la forma activa a la inactiva puede estar mediada por algunos lípidos. Estos forman distintas estructuras que se ven favorecidas por la presencia de algunas estructuras características de los fosfolípidos. En el review de Lee (Lee, 2004) se han reunido todas las evidencias experimentales encontradas y se presentan diversas simulaciones sobre la actividad de las membranas.

Como indicamos anteriormente, la distribución de cargas electrostáticas de los fosfolípidos de la membrana, establece restricciones al acomodamiento de los aminoácidos en función de su hidrofobicidad y polaridad. Véase las tablas de la Figura 16

MÜLLER et al.

Percentile distribution of amino acid residues facing lipid (out) or not facing lipid (in) in transmembrane helices

The structure of each protein was viewed. Residues exposed to the surface of the protein within the transmembrane domains were considered lipid-facing (out) and those buried in between helices were considered non-lipid-facing (in). The numbers of each residue were counted. The number for each amino acid residue was calculated as follows: the sum number of each amino acid residue for six nonmitochondrial proteins was divided by the total number of all 20 amino acid residues for either in or out. The same calculation was done for the four mitochondrial proteins. The top two rows are the sum of amino acid residues from bovine rhodopsin, bovine aquaporin 0, rat $K_v1.2$ channel, rabbit Ca^{2+} -ATPase, LTC_4S , and FLAP. The bottom two rows are the sum of four mitochondrial respiratory chain proteins.

	G	A	P	V	L	I	M	C	F	Y	W	H	K	R	E	D	Q	N	T	S
In	7.3	15.3	4.2	11.7	11.1	5.6	3.1	2.3	5.2	4.4	1.5	0.8	1.2	2.3	3.8	1.7	2.9	4.0	5.4	6.1
Out	5.2	7.6	1.9	10.9	22.8	11.4	2.7	1.3	13.3	3.5	3.5	0.8	1.6	3.5	1.3	0.5	2.2	0.5	2.7	2.4
In	10.2	10.3	2.0	7.1	10.2	6.2	5.8	1.0	7.3	4.1	3.0	4.1	1.9	2.8	1.9	2.5	2.0	2.4	7.4	7.5
Out	4.7	10.3	2.7	10.7	22.8	10.3	2.7	0.8	11.1	3.9	3.3	0.9	1.9	1.9	0.6	0.2	1.4	1.2	5.8	2.7

%

Distribution of lipid-facing (out) and non-lipid-facing (in) amino acid residues in transmembrane helices

The oligomeric structure (Table 1) of each protein was viewed. Residues exposed to the surface of the protein within the transmembrane domains were considered lipid-facing (out) and those buried between helices were considered non-lipid-facing (in). The numbers of each residue were counted.

Protein	G	A	P	V	L	I	M	C	F	Y	W	H	K	R	E	D	Q	N	T	S	Total Residues
Rho in	6	14	5	11	9	6	7	4	7	3	1	1	1	1	4	1	0	6	7	3	97
Rho out	4	5	4	10	14	14	5	0	14	8	2	2	0	1	1	0	2	1	5	2	94
$K_v1.2K^+$ in ^a	4	7	2	7	2	6	1	2	4	0	2	0	2	2	4	1	0	0	3	4	53
$K_v1.2K^+$ out ^a	1	2	1	4	13	7	1	0	9	1	1	0	0	4	0	1	0	0	1	1	47
AQP0 in	12	22	5	12	15	1	1	1	9	7	0	2	0	2	2	2	5	2	7	6	113
AQP0 out	3	3	0	7	12	6	1	2	7	1	3	0	0	1	0	0	0	0	1	2	49
ATPase in	6	14	4	14	17	13	5	3	2	1	2	1	3	2	7	3	5	8	4	10	124
ATPase out	6	6	1	9	22	10	2	1	8	1	6	0	3	3	3	1	3	0	3	2	90
LTC_4S in	4	10	3	5	8	1	0	1	3	5	1	0	0	3	1	0	2	0	2	3	52
LTC_4S out	2	8	0	4	15	1	0	1	3	2	1	0	0	3	0	0	2	0	0	2	44
FLAP in	3	6	1	7	2	0	1	0	0	5	1	0	0	1	0	1	2	3	3	3	39
FLAP out	3	4	1	6	8	4	1	1	8	0	0	1	3	1	1	0	1	1	0	0	44
Total in	35	73	20	56	53	27	15	11	25	21	7	4	6	11	18	8	14	19	26	29	478
Total out	19	28	7	40	84	42	10	5	49	13	13	3	6	13	5	2	8	2	10	9	368

Rho, bovine rhodopsin; AQP, bovine aquaporin 0; ATPase, rabbit Ca^{2+} -ATPase.^aS1 and S3 transmembrane helices are poly-Ala chains in the crystal structure so they were excluded from analysis; the molecule was analyzed as a tetramer.

Figura 16.- Distribución de los aminoácidos por su polaridad en la bicapa lipídica. Fuente: (Muller et al., 2008)

3.4 El ensamblado de las proteínas en la membrana.

La **dinámica del ensamblado de las proteínas en la membrana es aun hoy en día un mecanismo desconocido**. Algunos de los factores que parecen intervenir ya los hemos discutido, como son: La distribución disimilar de cargas por acumulación de ciertos aminoácidos el dominio intermembrana, la formación de posibles enlaces entre hélices y la presencia de lípidos transmembrana (colesterol) que actúen a modo de pegamento. **Pero estas son más bien fuerzas que mantienen la estructura terciaria y no son las que facilitan de manera determinante la inserción de la proteína en la membrana.**

Utilizando técnicas de microscopía electrónica se ha llegado a la conclusión que uno de los factores determinantes de la estabilización estructural de las proteínas en la membrana es la formación de oligómeros de proteína en la bicapa. En el caso de la rodopsina se ha comprobado la formación de dímeros y se está estudiando la importancia de este fenómeno incluso en el caso de los mGLuR

(http://en.wikipedia.org/wiki/Metabotropic_glutamate_receptor) se ha encontrado que la función está asociada al cambio de conformación de dos monómeros asociados por un puente de azufre (Fotiadis et al., 2004; Gurevich and Gurevich, 2008; Milligan, 2008; Milligan, 2007; Palczewski, 2006; Suda et al., 2004).

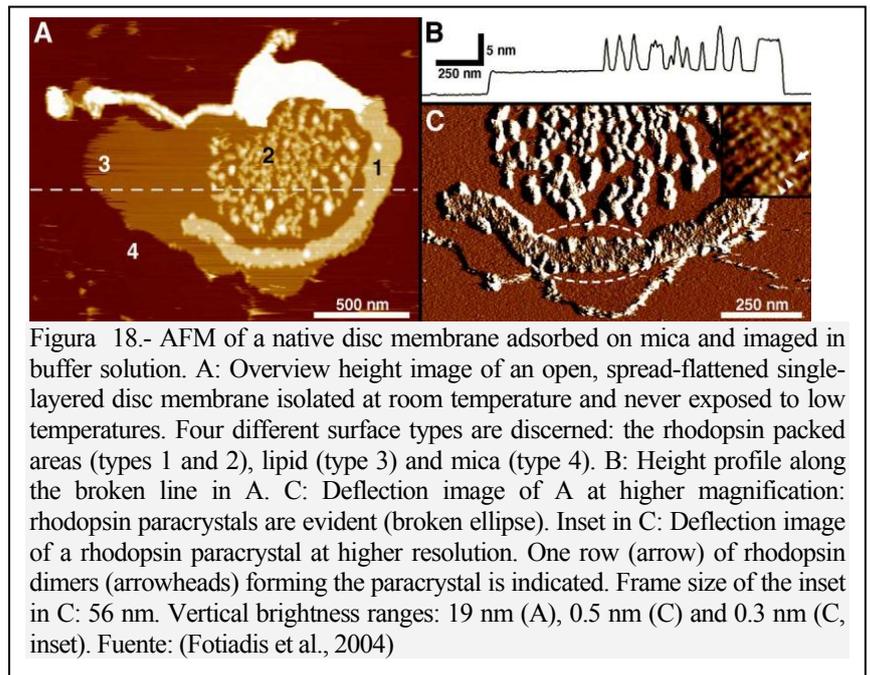


Figura 18.- AFM of a native disc membrane adsorbed on mica and imaged in buffer solution. A: Overview height image of an open, spread-flattened single-layered disc membrane isolated at room temperature and never exposed to low temperatures. Four different surface types are discerned: the rhodopsin packed areas (types 1 and 2), lipid (type 3) and mica (type 4). B: Height profile along the broken line in A. C: Deflection image of A at higher magnification: rhodopsin paracrystals are evident (broken ellipse). Inset in C: Deflection image of a rhodopsin paracrystal at higher resolution. One row (arrow) of rhodopsin dimers (arrowheads) forming the paracrystal is indicated. Frame size of the inset in C: 56 nm. Vertical brightness ranges: 19 nm (A), 0.5 nm (C) and 0.3 nm (C, inset). Fuente: (Fotiadis et al., 2004)

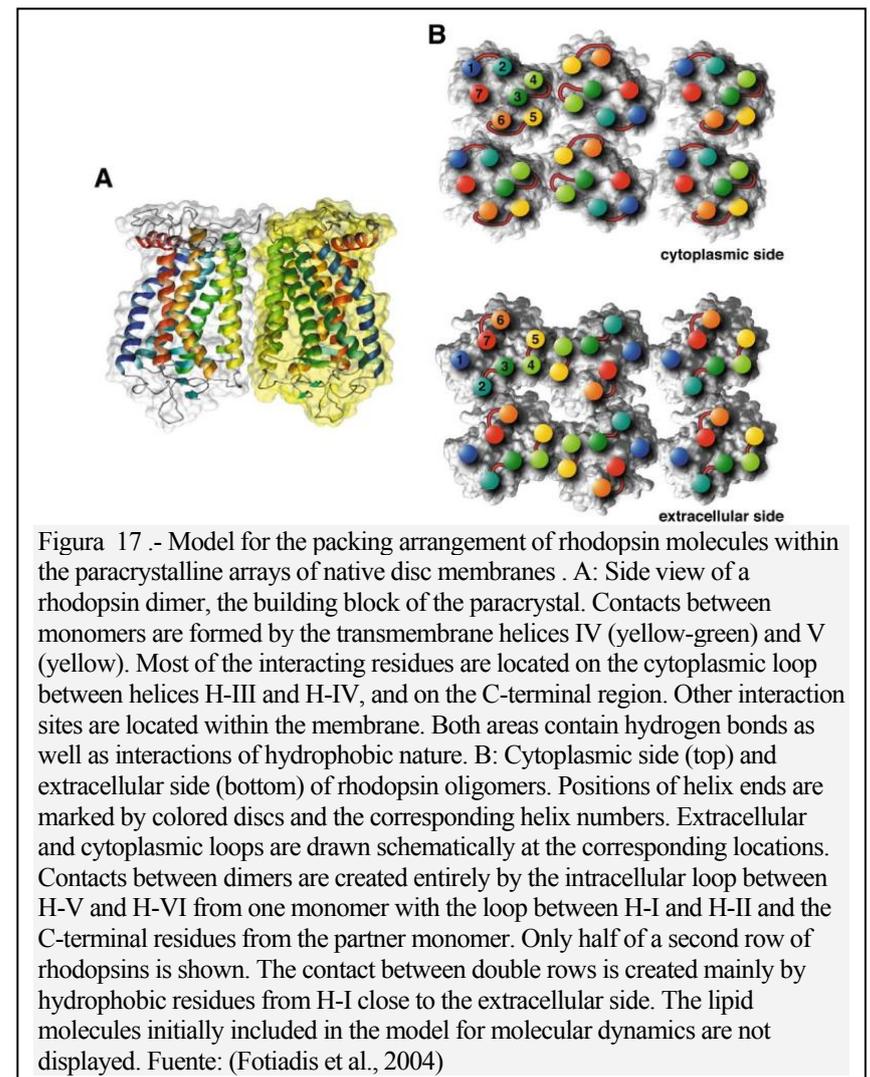
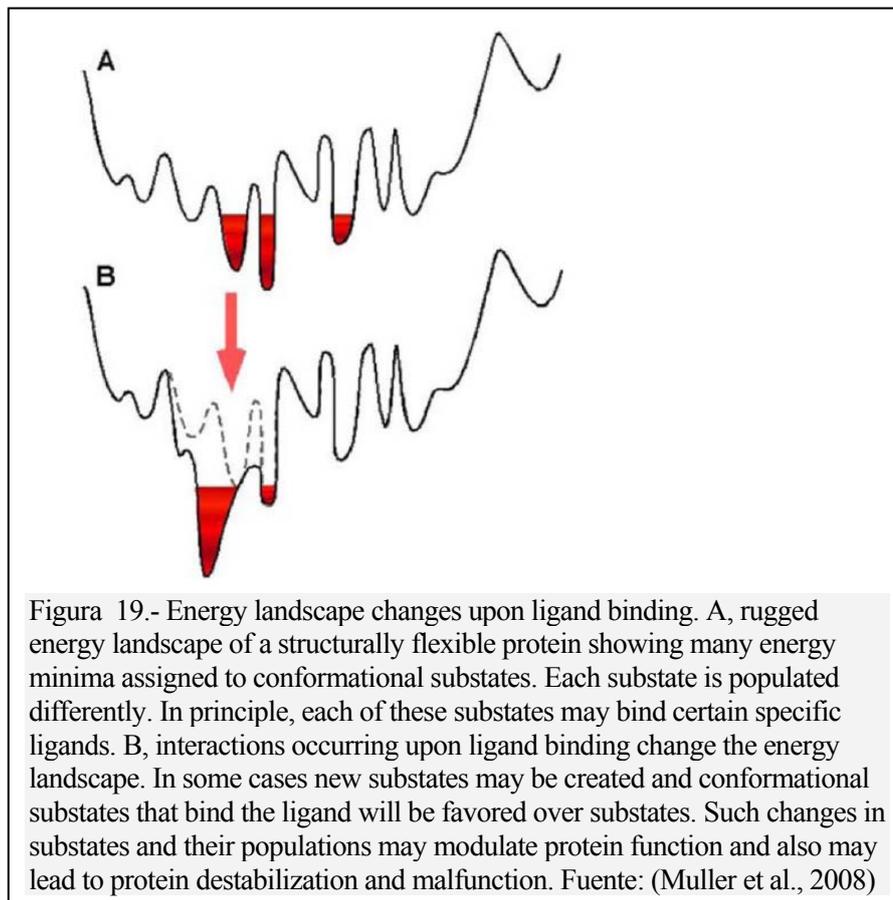


Figura 17.- Model for the packing arrangement of rhodopsin molecules within the paracrystalline arrays of native disc membranes. A: Side view of a rhodopsin dimer, the building block of the paracrystal. Contacts between monomers are formed by the transmembrane helices IV (yellow-green) and V (yellow). Most of the interacting residues are located on the cytoplasmic loop between helices H-III and H-IV, and on the C-terminal region. Other interaction sites are located within the membrane. Both areas contain hydrogen bonds as well as interactions of hydrophobic nature. B: Cytoplasmic side (top) and extracellular side (bottom) of rhodopsin oligomers. Positions of helix ends are marked by colored discs and the corresponding helix numbers. Extracellular and cytoplasmic loops are drawn schematically at the corresponding locations. Contacts between dimers are created entirely by the intracellular loop between H-V and H-VI from one monomer with the loop between H-I and H-II and the C-terminal residues from the partner monomer. Only half of a second row of rhodopsins is shown. The contact between double rows is created mainly by hydrophobic residues from H-I close to the extracellular side. The lipid molecules initially included in the model for molecular dynamics are not displayed. Fuente: (Fotiadis et al., 2004)

3.5 Las variaciones de energía del medio determinan el camino de reacción de las proteínas de membrana.

El plegado de las proteínas en la membrana, su conformación y función puede depender también de innumerables inter e intrarelaciones moleculares. Estas relaciones moleculares dependen en muchos casos de las interacciones con el medio tales como: variaciones locales del pH, concentraciones de electrolitos (o cargas eléctricas en ambas caras de la membrana), modificaciones bruscas de la temperatura, aumento de concentraciones de lípidos, otras proteínas o moléculas extrañas (por ejemplo fármacos).

En la Figura 19, se vemos como afecta a la estabilidad de los distintos estados conformacionales de una proteína la modificación de algún parámetro ambiental. En la figura A vemos el perfil energético y la población de los estados en una situación ambiental, y en B una vez se ha modificado dicho perfil energético. Se observa que en B después del cambio la población relativa de los tres conformeros de la figura A ha cambiado, e incluso el conformero más poblado en B, no se corresponde con ninguno de A.



4 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

Basado fundamentalmente en: (Mustafi and Palczewski, 2009; N.Barton and F.E.Blaney, 2007; Palczewski, 2006)

4.1 Introducción

En las secciones anteriores hemos visto la enorme importancia médica y farmacológica que tienen las proteínas de membrana. La diversidad de familias dentro de las proteínas de membrana es muy grande, cada una con sus características funcionales y estructurales. Sin embargo la biofísica del capítulo 1.5 es aplicable con mayor o menor coincidencia a todas las familias, y en especial a los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs en adelante). Los GPCRs tienen una característica distintiva: **A pesar de que sus secuencias tienen muy poca homología, las características topológicas se mantiene en toda la familia, se componen de 7 dominios transmembrana, tres dominios (loops) extracelulares y tres intracelulares, la parte N-Terminal es extracelular y la parte C-Terminal es intracelular**

En este capítulo, sentaremos las bases funcionales y estructurales de los GPCRs con especial atención a la familia de las Rodopsinas. Posteriormente, en siguientes capítulos aplicaremos técnicas computacionales para conocer su funcionamiento y como se aplica al desarrollo de fármacos.

4.2 Clasificación de los GPCRs

http://en.wikipedia.org/wiki/G_protein-coupled_receptor

Desde que en 1974 se publicaran las primeras secuencias de GPCRs, el número de receptores de esta familia ha crecido sorprendentemente hasta superar casi los 1000 (sin incluir los receptores olfativos que son aproximadamente 460), se observa que a pesar de esto, hay una falta general de homología entre las secuencias de la familia. No obstante los GPCRs se han agrupado tradicionalmente en 6 clases atendiendo fundamentalmente a la similitud de las secuencias de sus dominios transmembrana (7M) y a su función biológica (Schioth and Fredriksson, 2005).

- Clase A ([Rhodopsin-like](#)).
- Clase B ([Secretin receptor family](#))
- Clase C ([Metabotropic glutamate](#)/pheromone)
- Class D ([Fungal mating pheromone receptors](#))
- Class E ([Cyclic AMP receptors](#))
- Class F ([Frizzled/Smoothened](#))
- Huérfanos: Es el grupo de los cuales no se conoce su función (sobre 800)

GLIDA : GPCR-Ligand Database version 2.02 10/12/2008

GPCR Classification

- ▼ GPCR classes <GPCR:3257(HUMAN:1026 RAT:347 MOUSE:1884) / Ligand:30399>
 - ▶ Class A Rhodopsin like <GPCR:3004(HUMAN:918 RAT:289 MOUSE:1797) / Ligand:29878>
 - ▶ Class B Secretin like <GPCR:109(HUMAN:48 RAT:26 MOUSE:35) / Ligand:249>
 - ▶ Class C Metabotropic glutamate / pheromone <GPCR:96(HUMAN:40 RAT:25 MOUSE:31) / Ligand:272>
 - ▶ Class D Fungal pheromone <GPCR:0(HUMAN:0 RAT:0 MOUSE:0) / Ligand:0>
 - ▶ Class E cAMP receptors (Dictyostelium) <GPCR:0(HUMAN:0 RAT:0 MOUSE:0) / Ligand:0>
 - ▶ Ocular albinism proteins <GPCR:3(HUMAN:2 RAT:0 MOUSE:1) / Ligand:0>
 - ▶ Frizzled/Smoothened family <GPCR:45(HUMAN:18 RAT:7 MOUSE:20) / Ligand:0>
- ▼ Putative families <GPCR:284(HUMAN:41 RAT:42 MOUSE:201) / Ligand:0>
 - ▶ Vomeronasal receptors (V1R & V3R) <GPCR:180(HUMAN:13 RAT:7 MOUSE:160) / Ligand:0>
 - ▶ Taste receptors T2R <GPCR:104(HUMAN:28 RAT:35 MOUSE:41) / Ligand:0>
- ▼ Orphans <GPCR:197(HUMAN:117 RAT:16 MOUSE:64) / Ligand:11>
 - ▶ Putative / unclassified GPCRs <GPCR:197(HUMAN:117 RAT:16 MOUSE:64) / Ligand:11>

Pharmacoinformatics Laboratory, Kyoto University

[Introduction](#)
[GPCR Search](#)
[Ligand Search](#)
[Acknowledgments](#)
[Download Manual](#)

Figura 20.- Clasificación de los ligandos de los GPCRs, se indica en cada caso el número de componentes de cada familia. fuente:- <http://pharminfo.pharm.kyoto-u.ac.jp/services/glida/>

4.2.1 Elementos comunes de los GPCRs

Como ya hemos detallado, el dominio de siete hélices- α (7TM en adelante) es elemento común a todos los GPCRs. Este dominio se compone de regiones de entre 25 y 35 residuos con un alto grado de hidrofobicidad. Las siete hélices- α atraviesan la membrana en sentido anti-horario, formando tanto en el exterior como en el interior celular un motivo reconocido ampliamente por las técnicas de microscopía electrónica. Este motivo específico que “asoma” por la membrana, unido a la cavidad formada por las hélices es peculiar de los GPCRs. Esta parte de la secuencia de los GPCRs es generalmente la mejor conservada y es la que normalmente se emplea para identificar a los nuevos GPCRs y en minería de datos de genomas.

Otro elemento común son los residuos de cisterna en los loops extracelulares 1 y 2, que se encuentra en todas las familias de GPCRs de mamíferos con excepción de los receptores Taste2. Cabe destacar que no se ha encontrado un motivo común a las cinco familias de GPCRs.

La base de datos GPCRDB (<http://www.gpcr.org/7tm/data/>) contiene una clasificación de las GPCRs empleando perfiles. Desde su sección de “downloads” es posible descargarse tanto los alineamientos como los perfiles empleados para los alineamientos múltiples (Horn et al., 2003). Igualmente es posible identificar los residuos conservados por familias mediante JalView y RddB

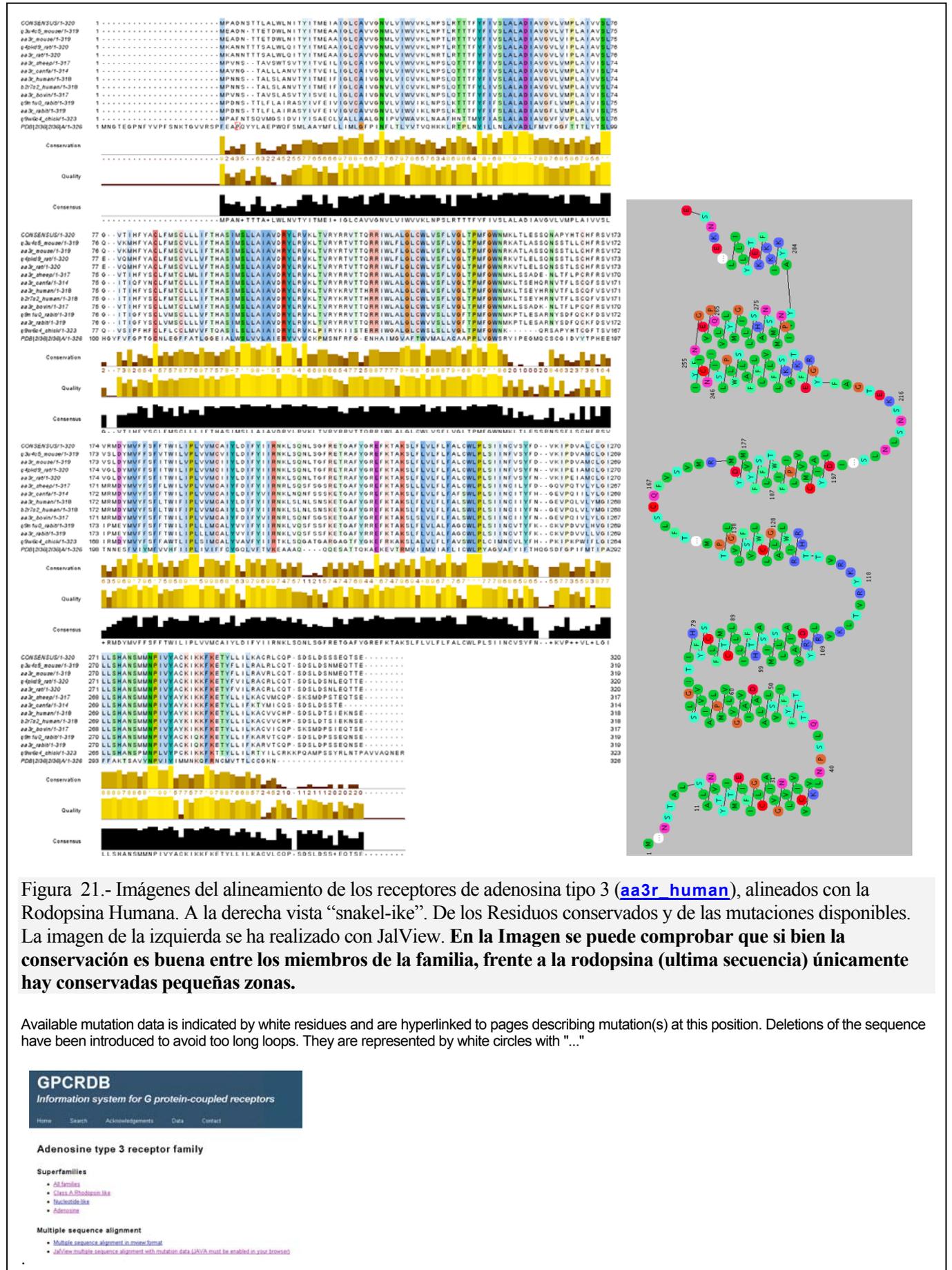


Figura 21.- Imágenes del alineamiento de los receptores de adenosina tipo 3 (aa3r_human), alineados con la Rodopsina Humana. A la derecha vista “snakel-ike”. De los Residuos conservados y de las mutaciones disponibles. La imagen de la izquierda se ha realizado con JalView. En la Imagen se puede comprobar que si bien la conservación es buena entre los miembros de la familia, frente a la rodopsina (ultima secuencia) únicamente hay conservadas pequeñas zonas.

Available mutation data is indicated by white residues and are hyperlinked to pages describing mutation(s) at this position. Deletions of the sequence have been introduced to avoid too long loops. They are represented by white circles with "..."

GPCRDB
Information system for G protein-coupled receptors

Home Search Acknowledgments Data Contact

Adenosine type 3 receptor family

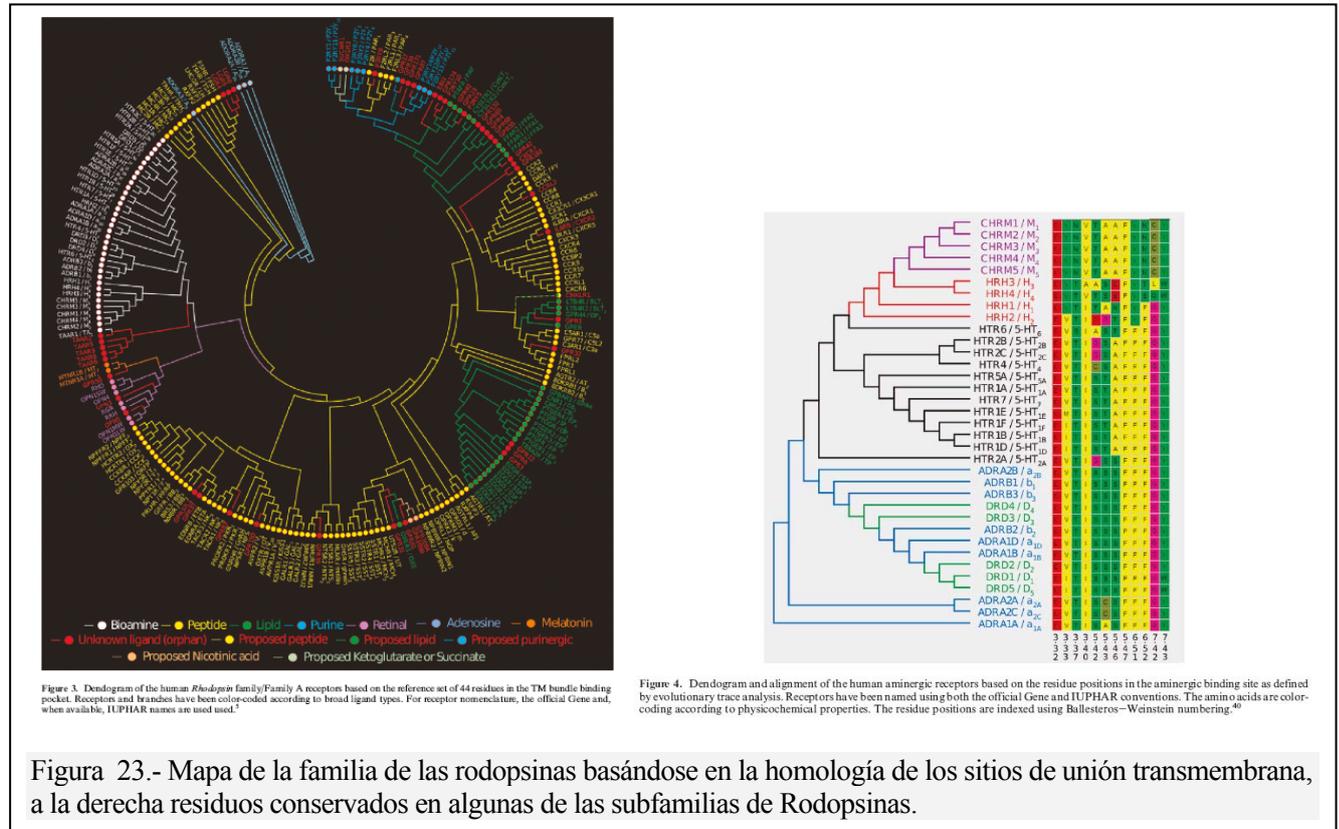
Superfamilies

- All families
- Class A (Rhodopsin like)
- Nucleotide-free
- Adenosine

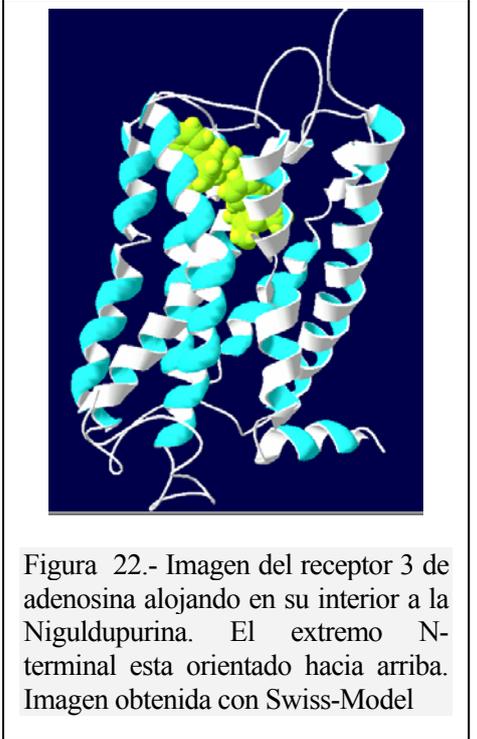
Multiple sequence alignment

- Multiple sequence alignment in tree format
- JalView multiple sequence alignment with mutation data (JalView must be installed in your browser)

Un reciente (y excelente) artículo de (Gloriam et al., 2009), **emplea estudios de homología de los motivos transmembrana para elaborar una clasificación detallada de los GPCRs tipo Rodopsina** (En adelante Rodopsinas). En este artículo se usa la homología de los sitios de unión de los ligandos para hacer un mapa de la familia de las rodopsinas.



Aunque los artículos de Palczewski y Gloriam de 2009 sean mucho más actuales, hay que destacar dos artículos de base (Fredriksson et al., 2003; Teller et al., 2003) que tratan la homología de los GPCRs. Estos estudios nacieron de la aplicación de técnicas de modelos ocultos de Markov sobre la integridad del genoma humano para cimentar las bases de la clasificación GRAFS. En su artículo de 2003 Fredriksson genera el primer mapa completo de los GPCRs de un mamífero, y muestra las relaciones de paralogía entre las familias. El estudio de Teller (y también Palczewski) es el primer estudio de homología-estructural detallado de la familia GPCR modelo por excelencia, las Rodopsinas. El método de puntuación incluye un término que penaliza los cambios energéticos (sobre todo fuerzas de enlaces de hidrógeno) en el sitio de unión del retinal, la estructura de referencia para hacer los modelos de homología es uno de los modelos de la Rodopsina (1HZX). Este estudio explica la diversidad fisiológica del sentido de la visión en los vertebrados, y fundamenta las bases moleculares de la modulación del sentido del color, aunque como bien dicen en la discusión, el análisis cuantitativo de la modulación no es posible mediante estas técnicas. La posibilidad de disponer de “genomas” enteros permitiría en un



futuro explicar la modulación (cualitativamente) de muchos sistemas fisiológicos mediante esta técnica.

4.2.2 La importancia del residuo N-Terminal

El residuo N-Terminal tiene un papel determinante en la funcionalidad de muchos GPCRs. Cuatro de las seis familias de GPCRs tienen un extremo N-Terminal largo que contiene diversos tipos de sitios de unión específicos. **Un ejemplo peculiar es receptor metabotrópico del glutamato** (Figura 48), que presenta un dominio extracelular con su propia estructura terciaria. Actualmente este dominio transmembrana se ha podido cristalizar y está sirviendo como base para el desarrollo de fármacos (<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EWK>). **Como veremos más adelante, la existencia de este dominio extracelular, no impide que algunos ligandos (o fármacos) encuentren su sitio de unión en los dominios transmembrana.** (Schiøth and Fredriksson, 2005; Schiøth et al., 2007).

Las “Adhesion GPCRs” tienen también un extremo N-Terminal largo debido a que su función principal es la transmisión entre células cercanas. En la familia de las “Secretin GPCRs” el extremo N-terminal sirve como sitio de unión a ligandos hormonales.

En el caso de las Rodopsinas, el extremo N-Terminal suele ser muy corto y normalmente el ligando tiene su sitio de unión entre las regiones 7M.(Figura 22). Existen sin embargo algunas rodopsinas con el sitio de unión en el extremo N-Terminal, como es el caso el receptor de la hormona luteizante http://en.wikipedia.org/wiki/Luteinizing_hormone/choriogonadotropin_receptor.

4.2.3 La clasificación de IUPHAR.

Una clasificación básicamente similar es la que puede encontrar en la base de datos [IUPHAR GPCR Database](#) (Foord et al., 2005; Harmar et al., 2009), **en la que están agrupados en 4 clases en función de la homología de las secuencias con tres prototipos: Rodopsina, secretina, y el receptor metabotrópico de glutamato. Adicionalmente se ha añadido los receptores “frizzled and smoothed” como una clase separada.** Esta clasificación está regulada y mantenida por la IUPHAR. La tabla de los GPCRs accesible desde la wikipedia está basada en esta clasificación.

Casi la mitad de los receptores de Clase 1 (Rodopsinas) se cree que son los responsables de la detección del olor, sabor y luz, aunque muchos de ellos han sido clasificados como sensoriales por razones de homología. Relativamente pocos receptores de la clase 1 tienen evidencia experimental de que actúan como receptores sensoriales. En la lista de la IUPHAR solo se incluyen los GPCRs no sensoriales, no incluyendo la familia de las opsinas, la familia de los sensores del gusto y del olfato y casi 400 potenciales sensores olfativos.

Transmembrane receptor: G protein-coupled receptors		
Class A: Rhodopsin like	Adrenergic	$\alpha 1$ (A, B, D) · $\alpha 2$ (A, B, C) · $\beta 1$ · $\beta 2$ · $\beta 3$
	Eicosanoid	CysLT (1, 2) · LTB4 (1, 2) · FPRL1 · OXE · Prostaglandin (DP (1, 2), EP (1, 2, 3, 4), FP) · Prostacyclin · Thromboxane
	Neuropeptide	B/W (1, 2) · FF (1, 2) · S · Y (1, 2, 4, 5) · Neuromedin (B, U (1, 2)) · Neurotensin (1, 2)
	Orphan	GPR (1, 3, 4, 6, 12, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 39, 42, 44, 45, 50, 52, 55, 61, 62, 63, 65, 68, 75, 77, 78, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 92, 101, 103, 109A, 109B, 119, 120, 132, 135, 137B, 139, 141, 142, 146, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 160, 161, 162, 171, 173, 174, 176, 177, 182)
	Purinergics	Adenosine (A1, A2A, A2B, A3) · P2Y (1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14)
Class B: Secretin like	Serotonin	(all but 5-HT3) 5-HT1 (A, B, D, E, F) · 5-HT2 (A, B, C) · 5-HT (4, 5A, 6, 7)
	Other	Acetylcholine (M1, M2, M3, M4, M5) · Adrenomedullin · Anaphylatoxin (C3a, C5a) · Angiotensin (1, 2) · Apelin · Bile acid · Bombesin (BRS3, GRPR, NMBR) · Bradykinin (B1, B2) · Cannabinoid (CB1, CB2) · Chemokine · Cholecystokinin (A, B) · Dopamine (D1, D2, D3, D4, D5) · EBI2 · Endothelin (A, B) · Estrogen · Formyl peptide (1, L1, L2) · Free fatty acid (1, 2, 3, 4) · FSH · Galanin (1, 2, 3) · Gonadotropin-releasing hormone (1, 2) · GHB receptor · Ghrelin · Histamine (H1, H2, H3, H4) · Kisspeptin · Luteinizing hormone/choriogonadotropin · lysophosphatidic acid (1, 2, 3) · Lysophospholipid (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) · MAS (1, 1L, D, E, F, G, X1, X2, X3, X4) · Melanocortin (1, 2, 3, 4, 5) · MCHR (1, 2) · Melatonin (1A, 1B, 1C) · Niacin (1, 2) · Motilin · Opioid (Delta, Kappa, Mu, Nociceptin & Zeta, but not Sigma) · Olfactory · Opsin (3, 4, 5, 1LW, 1MW, 1SW, RGR, RRH) · Orexin (1, 2) · Oxytocin · Oxoglutarate · PAF · Prokineticin (1, 2) · Prolactin-releasing peptide · Protease-activated (1, 2, 3, 4) · Relaxin (1, 2, 3, 4) · Somatostatin (1, 2, 3, 4, 5) · Sphingosine-1-phosphate (1, 2, 3, 4, 5) · SREB · Succinate · TAAR (1, 2, 3, 5, 6, 8, 9) · Tachykinin (1, 2, 3) · Thyrotropin · Thyrotropin-releasing hormone · Urotensin-II · Vasopressin (1A, 1B, 2)
Class C: Metabotropic glutamate / pheromone	Orphan	GPR (56, 64, 97, 98, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 123, 124, 125, 126, 128, 133, 143, 144, 157)
	Other	Brain-specific angiogenesis inhibitor (1, 2, 3) · Cadherin (1, 2, 3) · Calcitonin · CALCRL · CD97 · Corticotropin-releasing hormone (1, 2) · EMR (1, 2, 3) · Glucagon (GR, GIPR, GLP1R, GLP2R) · Growth hormone releasing hormone · PACAPR1 · GPR · Latrophilin (1, 2, 3, ELTD1) · Methuselah-like proteins · Parathyroid hormone (1, 2) · Secretin · Vasoactive intestinal peptide (1, 2)
Frizzled / Smoothened	Taste	TAS1R (1, 2, 3) · TAS2R (1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50)
	Other	Calcium-sensing receptor · GABA B (1, 2) · Glutamate receptor (Metabotropic glutamate (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)) · GPRC6A · GPR (156, 158, 179) · RAIG (1, 2, 3, 4)

Tabla 2.- Clasificación de los GPCRs. fuente: http://en.wikipedia.org/wiki/Transmembrane_receptor

4.3 Técnicas experimentales para el estudio de los GPCRs.

4.3.4 Estructuras disponibles mediante métodos de difracción y RMN.

La base de datos “Membrane Proteins Of Known Structure” (http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html) es un recurso que contiene todas las estructuras dilucidadas especialmente por técnicas de difracción de RX y de electrones (contiene algunas por RNN). En la actualidad tiene catalogadas 199 proteínas únicas en 538 ficheros pdb, 18 corresponden a bacteria-rodopsinas, mientras que únicamente 14 corresponden a GPCRs de vertebrados.

Podemos comprobar que las únicas GPCRs resueltas hasta el momento son:

- La Rodopsina de diferentes especies y en diferentes estados de activación y protonación <http://en.wikipedia.org/wiki/Rhodopsin>
- El receptor β_1 adrenérgico (http://en.wikipedia.org/wiki/Adrenergic_receptor)
- El receptor A_{2A} de adenosina (http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-2_adrenergic_receptor)

En concreto las estructuras disponibles en esta base de datos son:

G Protein-Coupled Receptors		
Rhodopsin: Bovine Rod Outer Segment, 2.8 Å. See also 1HZX	1F88	Palczewski et al. (2000)
Rhodopsin: Bovine Rod Outer Segment, 2.6 Å	1L9H	Okada et al. (2002)
Rhodopsin: Bovine Rod Outer Segment, 2.65 Å	1GZM	Li et al. (2004)
Rhodopsin: Bovine Rod Outer Segment, 2.2 Å	1U19	Okada et al. (2004)
Rhodopsin: Bovine Rod Outer Segment (expressed in COS cells), 3.4 Å Recombinant rhodopsin mutant, N2C/D282C	2J4Y	Standfuss et al. (2007)
Rhodopsin, photoactivated: Bovine Rod Outer Segment, 4.15 Å Ground state, rhombohedral crystals, 3.8 Å 2I35 . Ground state, trigonal crystals, 4.1 Å 2I36 .	2I37	Salom et al. (2006)
Rhodopsin in ligand-free state (opsin): Bovine Rod Outer Segment, 2.9 Å 2 molecules in asymmetric unit.	3CAP	Park et al. (2008)
Rhodopsin, Ops*-GαCT peptide complex: Bovine Rod Outer Segment, 3.2 Å	3DQB	Scheerer et al. (2008)
Rhodopsin: Squid (Todarodes pacificus), 2.5 Å	2Z73	Murakami & Kouyama (2008)
Rhodopsin: Squid (Todarodes pacificus), 3.7 Å Shows intracellularly extended cytoplasmic region.	2Z1Y	Shimamura et al. (2008)
Turkey β_1 adrenergic receptor (engineered), 2.7 Å Expressed in baculovirus.	2VT4	Warne et al. (2008)
Human β_2 adrenergic receptor, 3.4/3.7 Å from β_2AR365 -Fab5 complex. From $\beta_2AR24/365$ -Fab5 complex: 2R4S	2R4R	Rasmussen et al. (2007)
Engineered human β_2 adrenergic receptor, 2.4 Å T4 lysozyme replaces third intracellular loop. Reveals close association with cholesterol.	2RH1	Cherezov et al. (2007)
Engineered human β_2 adrenergic receptor, 2.8 Å T4 lysozyme replaces third intracellular loop. Reveals specific cholesterol binding site.	3D4S	Hanson et al. (2008)
Human A_{2A} adenosine receptor, 2.6 Å In complex with a high-affinity subtype-selective antagonist ZM241385.	3EML	Jaakola et al. (2008)

Tabla 3.- Estructuras completas de GPCRs. Fuente:
http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html

A las que hay que sumar las existentes en el “Protein Data Bank”, en donde actualmente hay 16 estructuras s “completas” de Rodopsina (no fragmentos) depositadas en el PDB (cluster #456).

Como vemos, en ausencia de estructuras cristalinas de de GPRCs, la mayor fuente de información estructural proviene de la espectroscopia crioelectrónica. Aún así esta técnica que en teoría es más resolutive, tiene varios problemas: Los cristales se destruyen por la potencia del haz de electrones, y se necesitan muchísimas muestras para obtener estructuras 3D (técnicamente se obtienen estructuras 2D que se transforman en 3D a base de cortes). No obstante la primera estructura 3D de la Rodopsina publicada en 1993 fue usando esta técnica. Desde la publicación en el año 2000 de la estructura por RX de la Rodopsina Bovina, esta técnica ha dejado casi de utilizarse.

Rhodopsin			
Cluster # 456 Members. Sequence cutoff: 100% Cluster size: 16 sequences			
Cluster	PDB id	Year	Details
1	1U19	2002	Crystal Structure of Bovine Rhodopsin at 2.2 Angstroms Resolution The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure Okada, T., Sugihara, M., Bondar, A.N., Elstner, M., Entel, P., Buss, V. (2004) <i>J.Mol.Biol.</i> 342 : 571-583 PubMed : 15327956
2	2G87	2006	Crystallographic model of bathorhodopsin Crystallographic analysis of primary visual photochemistry Nakamichi, H., Okada, T. (2006) <i>Angew.Chem.Int.Ed.Engl.</i> 45 : 4270-4273 PubMed : 16586416
3	1L9H	2002	Crystal structure of bovine rhodopsin at 2.6 angstroms RESOLUTION Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. Okada, T., Fujiyoshi, Y., Silow, M., Navarro, J., Landau, E.M., Shichida, Y. (2002) <i>Proc.Natl.Acad.Sci.USA</i> 99 : 5982-5987 PubMed : 11972040
4	3C9L	2008	Structure of ground-state bovine rhodopsin in a hexagonal crystal form Alternative models for two crystal structures of bovine rhodopsin. Stenkamp, R.E. (2008) <i>Acta Crystallogr.,Sect.D</i> 64 : 902-904 PubMed : 18645239
5	1HZX	2001	CRYSTAL STRUCTURE OF BOVINE RHODOPSIN Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). Teller, D.C., Okada, T., Behnke, C.A., Palczewski, K., Stenkamp, R.E. (2001) <i>Biochemistry</i> 40 : 7761-7772 PubMed : 11425302
6	1GZM	2004	Structure of Bovine Rhodopsin in a Trigonal Crystal Form Li, J., Edwards, P., Burghammer, M., Villa, C., Schertler, G.F.X. (2004) <i>J.Mol.Biol.</i> 343 : 1409 PubMed : 15491621
7	1F88	2000	Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., Miyano, M. (2000) <i>Science</i> 289 : 739-745 PubMed : 10926528
8	2HPY	2006	Local peptide movement in the photoreaction intermediate of rhodopsin Nakamichi, H., Okada, T. (2006) <i>Proc.Natl.Acad.Sci.USA</i> 103 : 12729-12734 PubMed : 16908857
9	3CAP	2008	Crystal Structure of Native Opsin: the G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin in its Ligand-free State. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.-W., Ernst, O.P. (2008) <i>Nature</i> 454 : 183-187 PubMed : 18563085
10	3DQB	2008	Crystal structure of the active G-protein-coupled receptor opsin in complex with a C-terminal peptide derived from the Galpha subunit of transducin Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation Scheerer, P., Park, J.H., Hildebrand, P.W., Kim, Y.J., Krauss, N., Choe, H.-W., Hofmann, K.P., Ernst, O.P. (2008) <i>Nature</i> 455 : 497-502 PubMed : 18818650
11	2PED	2007	Crystallographic model of 9-cis-rhodopsin Photoisomerization mechanism of rhodopsin and 9-cis-rhodopsin revealed by x-ray crystallography Nakamichi, H., Buss, V., Okada, T. (2007) <i>Biophys.J.</i> 92 : L106-L108 PubMed : 17449675
12	2I35	2006	Crystal structure of rhombohedral crystal form of ground-state rhodopsin Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin.

Rhodopsin			
Cluster # 456 Members. Sequence cutoff: 100% Cluster size: 16 sequences			
Cluster	PDB id	Year	Details
			Salom, D., Lodowski, D.T., Stenkamp, R.E., Trong, I.L., Golczak, M., Jastrzebska, B., Harris, T., Ballesteros, J.A., Palczewski, K. (2006) Proc.Natl.Acad.Sci.Usa 103 : 16123-16128 PubMed : 17060607
14	2I36	2006	Crystal structure of trigonal crystal form of ground-state rhodopsin Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. Salom, D., Lodowski, D.T., Stenkamp, R.E., Trong, I.L., Golczak, M., Jastrzebska, B., Harris, T., Ballesteros, J.A., Palczewski, K. (2006) Proc.Natl.Acad.Sci.Usa 103 : 16123-16128 PubMed : 17060607
13	2I37	2006	Crystal structure of a photoactivated rhodopsin Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. Salom, D., Lodowski, D.T., Stenkamp, R.E., Trong, I.L., Golczak, M., Jastrzebska, B., Harris, T., Ballesteros, J.A., Palczewski, K. (2006) Proc.Natl.Acad.Sci.Usa 103 : 16123-16128 PubMed : 17060607
15	1LN6	2002	STRUCTURE OF BOVINE RHODOPSIN (Metarhodopsin II) Structural studies of metarhodopsin II, the activated form of the G-protein coupled receptor, rhodopsin. Choi, G., Landin, J., Galan, J.F., Birge, R.R., Albert, A.D., Yeagle, P.L. (2002) Biochemistry 41 : 7318-7324 PubMed : 12044163
16	1JFP	2001	Structure of bovine rhodopsin (dark adapted) Studies on the structure of the G-protein-coupled receptor rhodopsin including the putative G-protein binding site in unactivated and activated forms. Yeagle, P.L., Choi, G., Albert, A.D. (2001) Biochemistry 40 : 11932-11937 PubMed : 11570894

Tabla 4.- Estructuras de rodopsina completas depositadas en el PDB. Fuente:

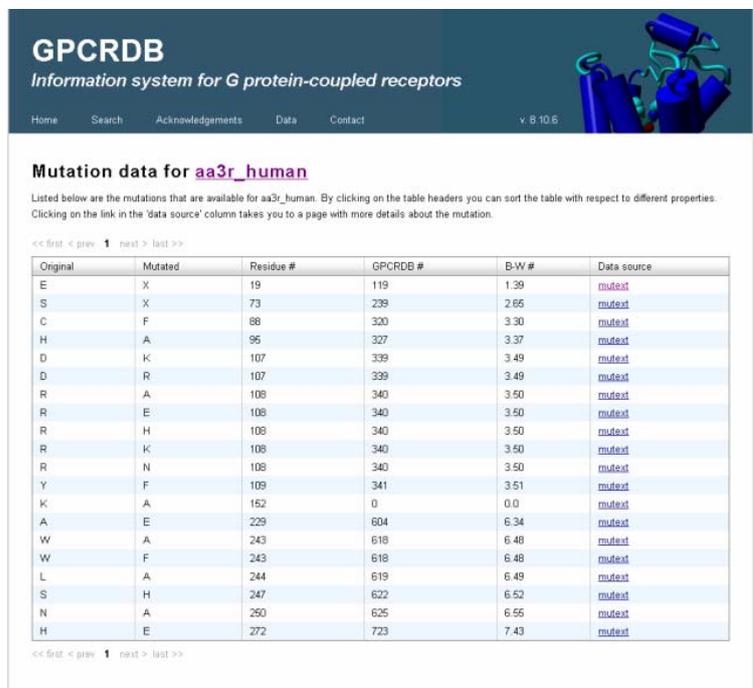
<http://www.pdb.org/pdb/explore/sequenceCluster.do?structureId=2I35&entity=1&cluster=456&seqid=100>

Los estudios de RMN clásicos, si bien no son capaces de generar una estructura completa (por la enorme complejidad de análisis), si que son útiles para determinar las distancias intraatómicas en pequeños dominios (previa protonación o marcado) y para el estudio conformacional de los loops extracelulares. Mas recientemente, mediante RMN en estado solidó, se están resolviendo las geometrías de las interacciones proteína – ligando en diferentes estados. **Cabe destacar que la conformación del retinal (ligando de la rodopsina) en su estado activo e inactivo ha sido resuelto mediante esta técnica.** En el artículo de (N.Barton and F.E.Blaney, 2007) se detallan referencias adicionales sobre el uso de esta técnica.

4.3.5 Técnicas bioquímicas

La principal fuente de información estructural de los GPCRs actualmente se esta obteniendo mediante técnicas

bioquímicas, en concreto con mutagénesis dirigida (SDM) (http://en.wikipedia.org/wiki/Site-directed_mutagenesis). La SDM fue desarrollada por Michel Smith en 1978 (lo que le valio el



GPCRDB
Information system for G protein-coupled receptors

Home Search Acknowledgements Data Contact v. B 10.6

Mutation data for aa3r_human

Listed below are the mutations that are available for aa3r_human. By clicking on the table headers you can sort the table with respect to different properties. Clicking on the link in the 'data source' column takes you to a page with more details about the mutation.

Original	Mutated	Residue #	GPCRDB #	B-W #	Data source
E	X	19	119	1.39	mutext
S	X	73	239	2.65	mutext
C	F	88	320	3.30	mutext
H	A	96	327	3.37	mutext
D	K	107	339	3.49	mutext
D	R	107	339	3.49	mutext
R	A	108	340	3.50	mutext
R	E	108	340	3.50	mutext
R	H	108	340	3.50	mutext
R	K	108	340	3.50	mutext
R	N	108	340	3.50	mutext
Y	F	109	341	3.51	mutext
K	A	152	0	0.0	mutext
A	E	229	604	6.34	mutext
W	A	243	618	6.48	mutext
W	F	243	618	6.48	mutext
L	A	244	619	6.49	mutext
S	H	247	622	6.52	mutext
N	A	250	625	6.55	mutext
H	E	272	723	7.43	mutext

Figura 24.- Datos de SDM del receptor 3 de la adenosina.

premio novel). Esta técnica supone modificar (o sustituir) uno de los residuos de la cadena por otro para medir (con el pK o IC50 – EC50) su cambio de actividad sobre distintos ligandos.

En la actualidad el SDM es la técnica bioquímica básica de todos los procesos de diseño “racional” de fármacos. El proceso consiste en partir de una hipótesis sobre el sitio de unión de un fármaco conocido, e ir modificando los residuos uno a uno que se supone que interaccionan por cercanía, para posteriormente medir la constante de equilibrio de la interacción y verificar la hipótesis del sitio de unión.

La base de datos tinyGRAP (<http://www.cmbi.ru.nl/tinygrap/credits/>) dispone de una gran cantidad de ensayos de SDM de GPCRs. Igualmente, GPCRDB dispone de links sobre los ensayos de SDM de cada receptor catalogado (ver Figura 24).

Otra de las técnicas bioquímicas empleadas es el método de sustitución de la cisteína (SCAM). Dado que la cisteína es un aminoácido “pequeño”, la sustitución de un aminoácido de la cadena por cisteína no va a modificar su estructura secundaria. Sin embargo, el grupo sulfhídrico de esta es muy reactivo en medio acuoso. De esta forma se pueden introducir marcador o reactivos en los hipotéticos sitios de unión y comprobar su efecto por técnicas espectroscópicas diversas.

4.4 Análisis de la estructura de la Rodopsina como modelo de los GPCRs.

4.4.6 Importancia de la Rodopsina como modelo de GPCRs

Hasta ahora hemos comprobado que las GPCRs junto con los ligandos (transmisores) son los principales actores de la comunicación celular. Entre las clases de GPCRs, sin duda destacan las Rodopsinas. Son los transmisores mejor estudiados por una razón principal: Durante mucho tiempo solo se dispuso de su estructura tridimensional de partida sobre la que realizar hipótesis del resto de transmisores. El resto de GPCRs han tenido que ser modeladas a partir de la estructura cristalina de la Rodopsina bovina. Y no solo eso, sino también los mecanismos fisiológicos y moleculares que se han podido explicar mediante esta estructura han servido como modelo para el resto de GPCRs.

En la literatura existen abundantes referencias que tratan sobre la estructura de la Rodopsina y sus implicaciones en el campo de los receptores de membrana. Sin embargo he realizado una selección de los o artículos, principalmente reviews, que considero claves y que me han servido para entender la estructura de la rodopsina. Aquí simplemente veremos algunas imágenes, puesto que en los artículos originales hay toda clase de detalles que escapan al objetivo de este texto (y no sería más que hacer copy-paste). Los artículos que he utilizado como base son:

- (Menon et al., 2001). ***Rhodopsin: structural basis of molecular physiology***: Aunque antiguo, contiene una excelente descripción de la primera estructura con todo lujo de detalles y una primera explicación molecular de la fisiología de la visión.
- (Mustafi and Palczewski, 2009). ***Topology of class A G protein-coupled receptors: insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors***: Es el último artículo del autor de las últimas estructuras de Rodopsina. En él se actualizan las implicaciones que suponen las últimas estructuras de Rodopsina publicadas en los estados activo e inactivo.
- (Palczewski, 2006). ***G protein-coupled receptor rhodopsin***. Imprescindible. Es un artículo corto pero con abundantes imágenes de la estructuras a fecha de 2006: En ese momento

Palczewski tenía muy claro que el siguiente paso era obtener las estructuras de los estados activos.

- (Patny et al., 2006). **Homology modeling of G-protein-coupled receptors and implications in drug design.** Es el A-B-C del modelado por homología de GPCRs. Hace una explicación detallada de todo el proceso de modelado a partir de la estructura de la Rodopsina.
- (Wess et al., 2008). **Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation.** Su título habla por sí solo, resaltar que es un artículo poco especulativo, resume magistralmente todas las evidencias experimentales que hay hasta el momento sobre los mecanismos de activación a nivel estructural.
- (Kobilka and Deupi, 2007). **Conformational complexity of G-protein-coupled receptors.** Si se quiere entender definitivamente la relación entre la actividad de los fármacos y la estructura de los GPCRs. Los gráficos de los perfiles de energía están excelentemente explicados.
- (Bhattacharya et al., 2008). **Agonist-induced conformational changes in bovine rhodopsin: insight into activation of G-protein-coupled receptors.** Es la aplicación del artículo de Kobilka al caso de la Rodopsina.
- (Tomasello et al., 2009). **Electrostatic control of the photoisomerization efficiency and optical properties in visual pigments: on the role of counterion quenching.** Personalmente, es el artículo publicado más importante de los últimos dos años sobre rodopsinas. Es la primera aplicación de técnicas de química cuántica ab-initio al estudio de los cambios conformacionales del retinal durante la fotoexcitación. No comentare nada de él en este texto, puesto que escapa de los objetivos, pero personalmente no podría dejar de citarlo.

La exposición de este epígrafe pasará por describir los elementos fundamentales de la estructura de la Rodopsina para después tratar el modelado por homología del resto de GPCRs. Por último trataremos el tema con mayor actualidad de los GPCRs, que son los cambios conformacionales debidos a la activación e inactivación de los receptores.

4.4.7 Ciclo de activación de la rodopsina.

El mecanismo fisiológico y molecular de la visión está bien establecido gracias a la especial atención que se le ha dado a la rodopsina como receptor modelo. La rodopsina en este aspecto es un receptor atípico, pues mantiene un enlace covalente del tipo base de Schiff, con su ligando el retinal a través del residuo LYS296. La rodopsina (junto con su ligando) son los

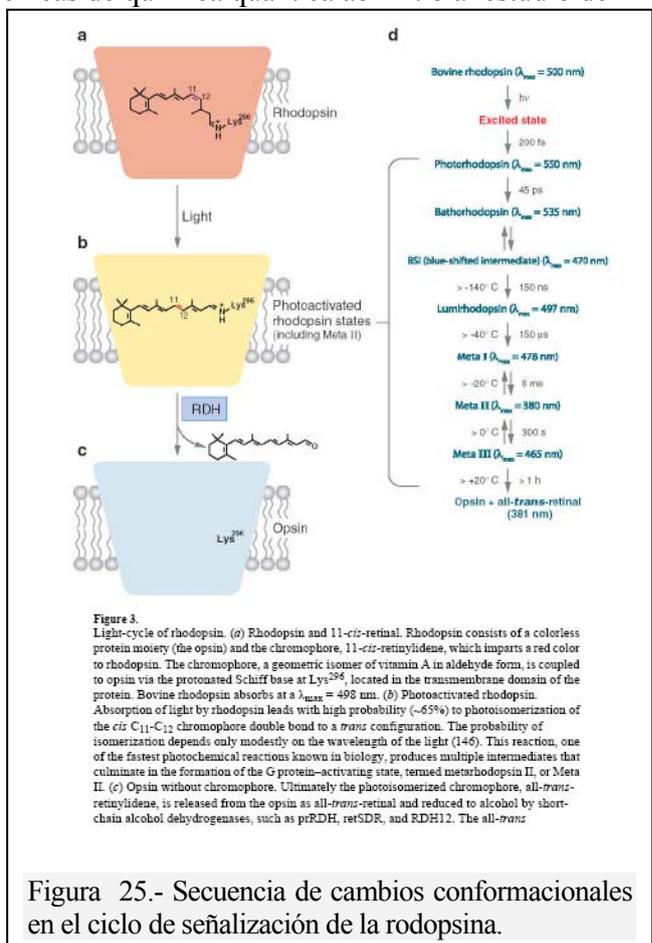


Figura 25.- Secuencia de cambios conformacionales en el ciclo de señalización de la rodopsina.

responsables de detectar el blanco el negro y algunos tonos de gris. Se encuentran situados en las células tipo bastón de la retina en los discos intermembrana.

El proceso comienza en al recibir un botón de luz el retinal, el cromóforo que originalmente esta en forma de 11-cis-retinal y unido mediante la base de schiff a la rodopsina, este complejo de denomina “Rodopsina inactiva”. Tras la absorción del fotón el 11-cis-retinal se isomeriza a la conformación all-trans-retinal. La isomerización del cromóforo induce una secuencia de cambios conformacionales en la estructura de la Rodopsina que ocasionan que pase a su “estado activado”.

La forma final activa del receptor es la denominada Meta-rodopsina II, que se relaja transmitiendo la señal a su proteína G (trasnducin), que inicia una cascada de reacciones bioquímicas que tienen como resultado una señal neuronal. El proceso concluye al liberarse el all-trans-retinal de la rodopsina, que queda en una forma libre denominada opsina.

El proceso puede volver a comenzar cuando el ligando 11-cis-retinal vuelve a unirse a la opsina formando una nueva Rodopsina lista para recibir un fotón. El proceso por el cual el 11-cis-retinal vuelve a formar la base de schiff con la opsina, aun no esta totalmente dilucidado. Se cree que la salida del all-tras-retinal se produce por la parte superior de la rodopsina, mientras que la entrada es por uno de los laterales entre las hélices.

Todo este complejo fenómeno de intermedios e isómeros del ligando, unido a la facilidad de cristalización de la rodopsina es lo que la convierte en la proteína ideal para el estudio del mecanismo de acción de los GPCRs.

4.4.8 Estructura cristalina en el estado basal de la rodopsina. Estado inactivo.

Como modelos cristalográficos de referencia usaremos la ultima serie de estructuras publicadas por Palczewski, que corresponden a las entradas de PDB: [2i35](#) [2i36](#) [2i37](#) . En concreto, la primera entrada que corresponde a la Rodopsina bovina resuelta por RX a 3.6 A incluyendo al ligando, es la que usaremos para estudiar la forma inactiva.

El fichero pdb contiene una molécula de proteína en la celda unidad, así como una molécula de palmitol. Lo primero que nos encontramos al abrir el fichero pdb con swiss-model es un log indicándonos que hay algunos átomos perdidos. Esto es algo normal en los pdb cristalográficos, de hecho el software de visualización suele tener opciones de reparación. En este caso al ser uno de los últimos aminoácidos no le daremos más importancia(Es debido a que en el extremo C-Terminal existen algunos aminoácidos modificados durante la cristalización).En otros visualizadores como Rasmol nos podemos encontrar algo como esto:

Crystal structure of rhombohedral crystal form of ground-state rhodopsin **2i35**

DOI: 10.2210/pdb/2i35/pdb

Primary Citation
 Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. Salom, D., Ludowski, D.J., Steenkamp, R.E., Trong, I.L., Golczak, M.J., Jastrzebska, B., Harris, T., Ballesteros, J.A., Palczewski, K. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103: 16123-16128
 PubMed: 17060607 Search Related Articles in PubMed

PubMed Abstract:
 The changes that lead to activation of G protein-coupled receptors have not been elucidated at the structural level. In this work we report the crystal structures of both ground state and a photoactivated deprotonated intermediate of bovine rhodopsin at a ... [Read More & Search PubMed Abstracts]

Molecular Description
 Classification: Membrane Protein
 Structure Weight: 40866.05
 Molecule: Rhodopsin
 Polymer: 1 Type: polypeptide(L) Length: 349
 Chems: A

Source
 Polymer: 1 Scientific Name: Bos taurus Common Name: Cattle
 Polymer: 2 Scientific Name: Synthetic construct
 Polymer: 3 Scientific Name: Synthetic construct

Related PDB Entries

Id	Details
2i36	2i36 is the crystal structure of trigonal form of ground-state rhodopsin determined at 4.10 angstrom resolution
2i37	2i37 is the crystal structure of photoactivated rhodopsin determined at 4.15 angstrom resolution

Ligand Chemical Component

Identifier	Name	Formula	Links
PLM	PALMITIC ACID	C16 H32 O2	
RET	RETINAL	C20 H28 O	

Experimental Details
 Method: X-RAY DIFFRACTION
 Experimental Data: 3.80
 Resolution[Å]: 3.80
 R-Value: 0.375 (obs.)
 R-Free: 0.418
 Space Group: H 3 2
 Unit Cell:
 Length [Å] Angles [°]
 a = 277.53 o = 90.00
 b = 277.53 β = 90.00
 c = 66.32 γ = 120.00

Figura 26.- Entrada pdb 2i35.

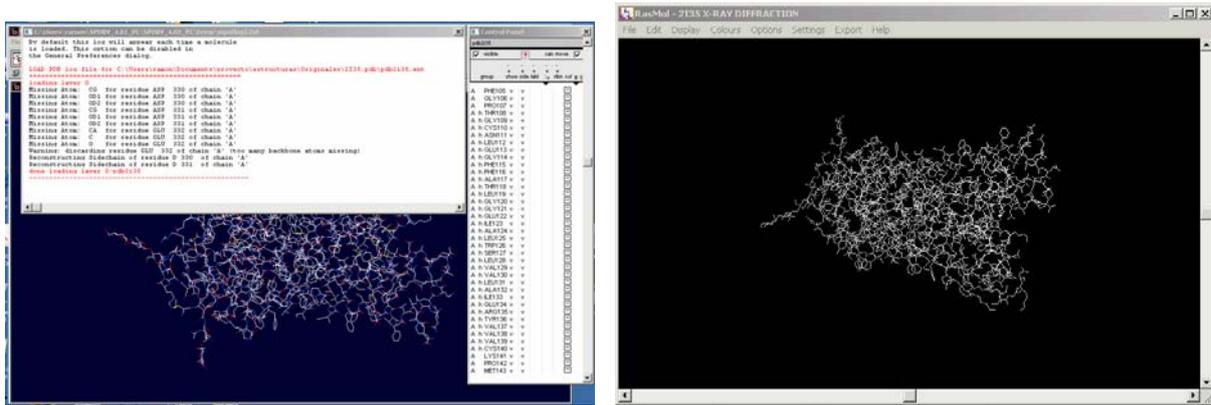


Figura 27

La forma más cómoda de visualizar los elementos de la Rodopsina es mediante “ribbons” con Chimera. Este es un excelente visualizador con multitud de opciones para ver proteínas y su interacción con los ligandos.

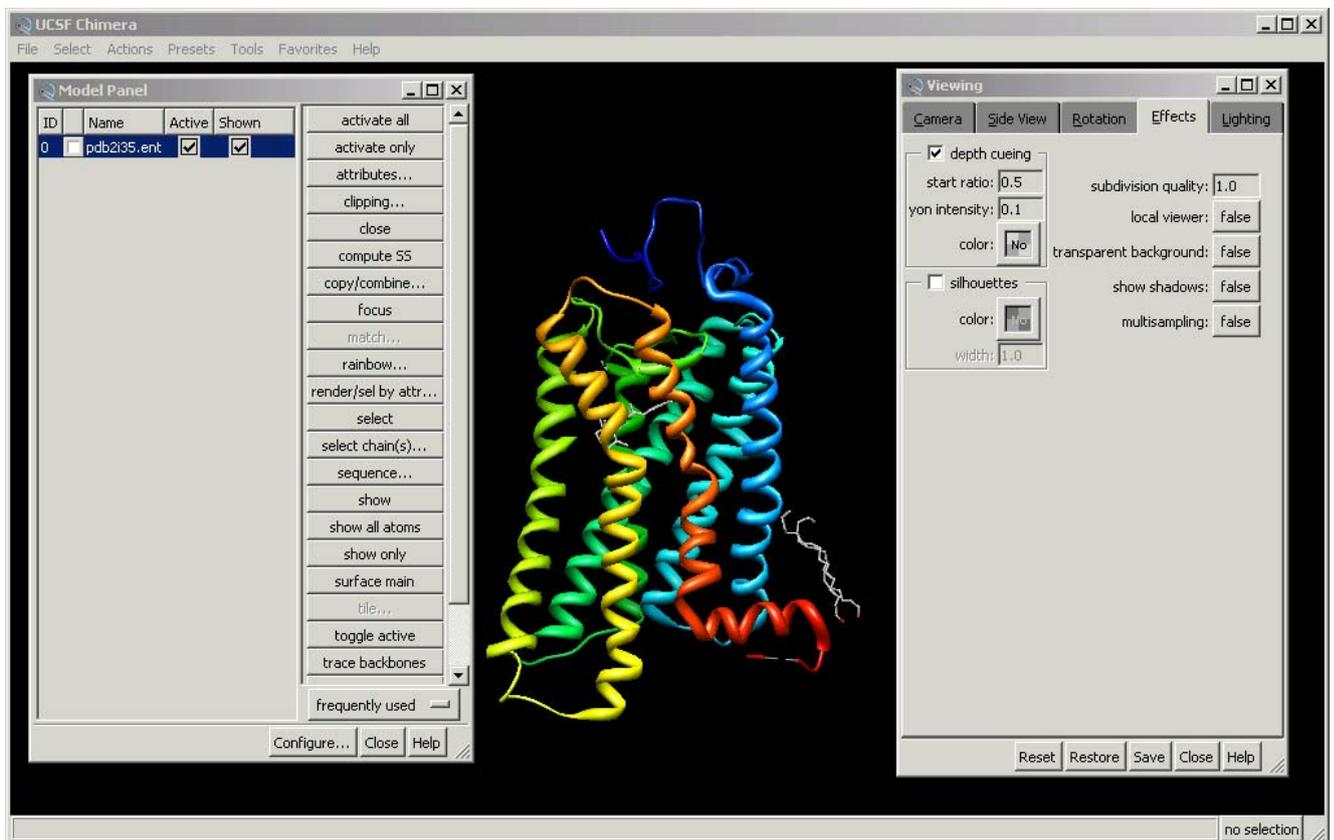


Figura 28.- Apariencia del entorno de Chimera con la rodopsina (2i35) al fondo.

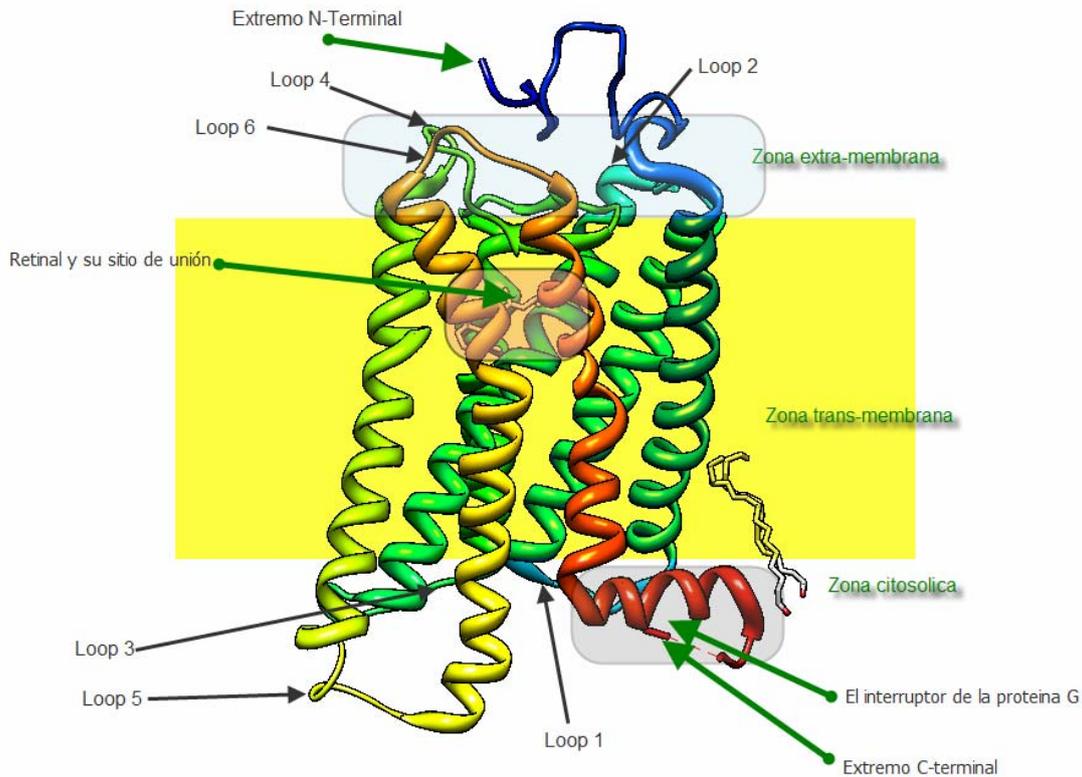


Figura 30.- Imagen de la rodopsina generada con Chimera. Se indican las zonas más importantes. La región intermembrana es la que se sitúa en el fondo amarillo aproximadamente. Se aprecia con claridad el “interruptor” de la proteína G, justo antes del extremo C-Terminal (el ligando que aparece encima es el palmitol,, que forma parte de la estructura cristalográfica). Las hélices alfa suben hacia el exterior en sentido antihorario. *Imagen generada con chimera.*

La Figura 30 es la imagen clásica de la rodopsina y por extensión la que adoptan todos los GPCRs. Los elementos clave de esta estructura son:

1. El distinto tamaño de las hélices, que están entre 20 y 33 residuos,
2. La irregularidad de las hélices, no son paralelas entre si, formando distintos ángulos con respecto a la membrana. La mayor irregularidad se encuentra en la hélice VI, en el residuo PRO267 uno de los residuos mejor conservados de la familia de los GPCRs.
3. La posición que adopta el retinal en el interior de las hélices. A la altura del LYS296 (anclaje del retinal) hay dos residuos PRO292 y PRO303, que también deforman la hélice 7 y uno de ellos forma parte de otro motivo conservado, el NPXXY.

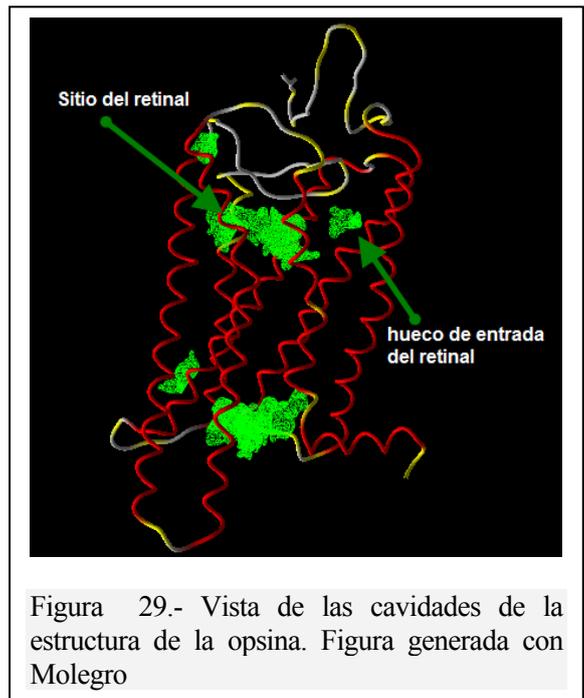


Figura 29.- Vista de las cavidades de la estructura de la opsina. Figura generada con Molegro

- Los tres loops superiores, que pueden interactuar con el ligando que esta en el interior como con otros ligandos por la zona extramembrana, en donde son características dos pares de laminas beta. El loop 2 esta unido a a la helice 3 mediante un puente de azufre.
- El extremo C-terminal es el “interruptor” de la proteína G acoplada. En esta zona esta el motivo (D/E)R(Y/W) que se encuentra en toda la familia A de GPCRs.
- Entre las hélices V y VI en la estructura se abre un hueco que se cree que es la entrada y salida del retinal. En la estructura 3CAP (estructura de la opsina) se aprecia con claridad.

En la Figura 31, tenemos la vista superior de la rodopsina. El paquete de loops, cierran la entrada al interior de las hélices, aunque durante el proceso de activación parte de estos loops se levantan abriéndose un canal iónico.

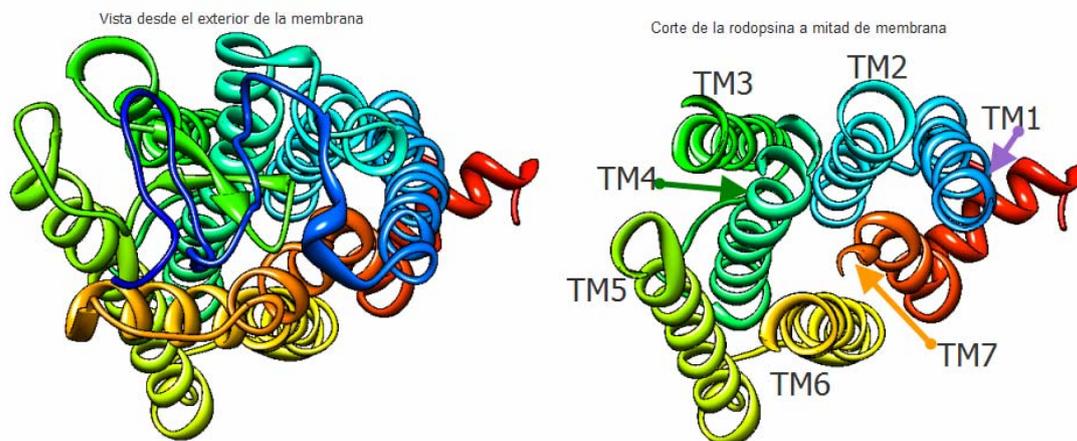
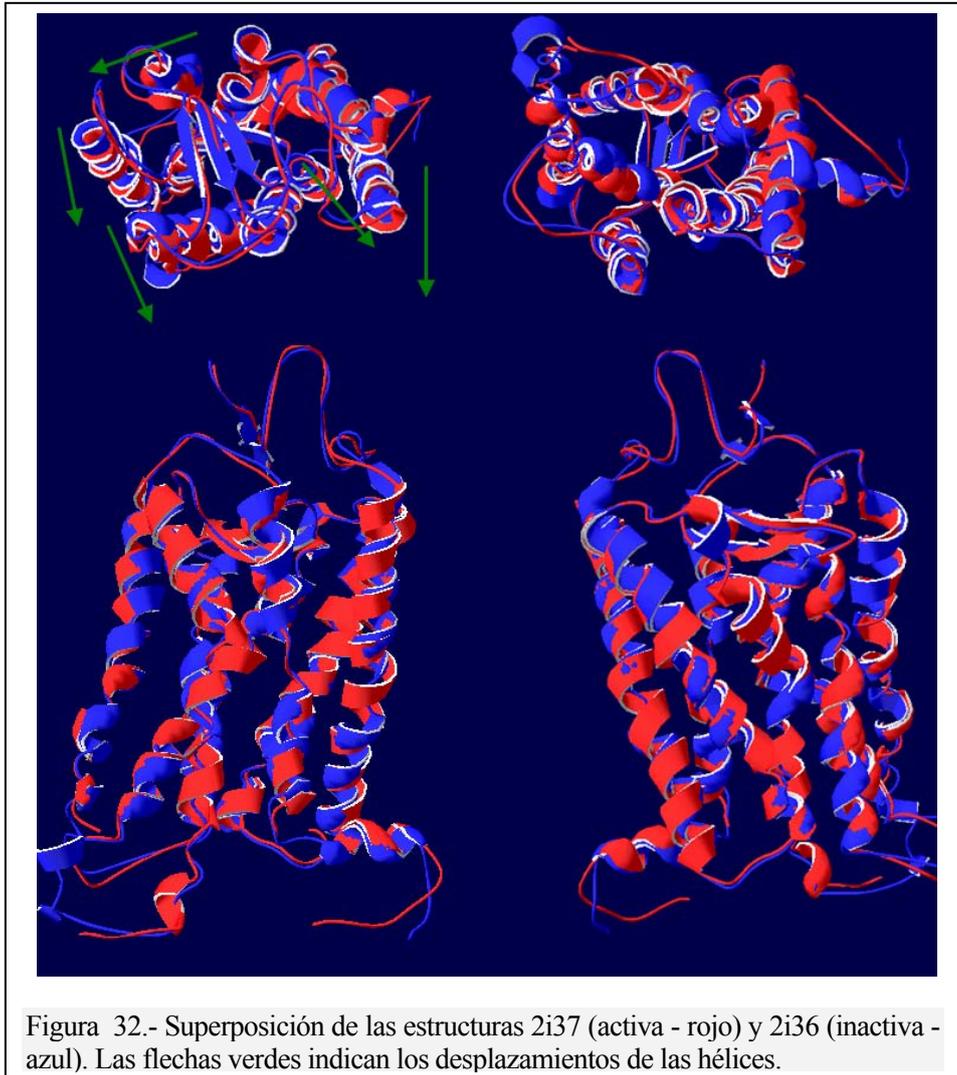


Figura 31.- Vista de la rodopsina desde el exterior de la membrana. A la izquierda se puede apreciar en azul el extremo N-Terminal. En verde una región que forma una lamina Beta, y en rojo y azul claro los dos restantes loops extracelulares (mucho más cortos). A la derecha vemos como las hélices no suben exactamente perpendiculares a la membrana, sino que están ligeramente inclinadas, formando como un abanico. Esta inclinación parece ser debida a la ordenación estructural de los paquetes interno y externos de loops (En concreto los más estables parecen ser los formados por las laminas beta). *Imagen generada con Chimera.*

4.4.9 Estructura cristalina en el estado activo de la rodopsina.

Esencialmente no hay ya mucho más que ver sobre la estructura de la rodopsina que no este explicado en los abundantes artículos sobre el tema, pero desde 2006 esta accesible desde pdb la estructura 2i37 da la rodopsina en estado activo. Esta estructura ha marcado un antes y un después en los conocimientos de biología estructural y demuestra que los GPCRs son elementos esencialmente plásticos. El esqueleto de aminoácidos es ligeramente flexible y los residuos que están “colgados” giran sobre sus enlaces hasta alcanzar la posición más favorable en cada conformación. El proceso de la foto-transducción dura entorno a los 300 ns, 150 hasta la activación y 150 hasta la desactivación.

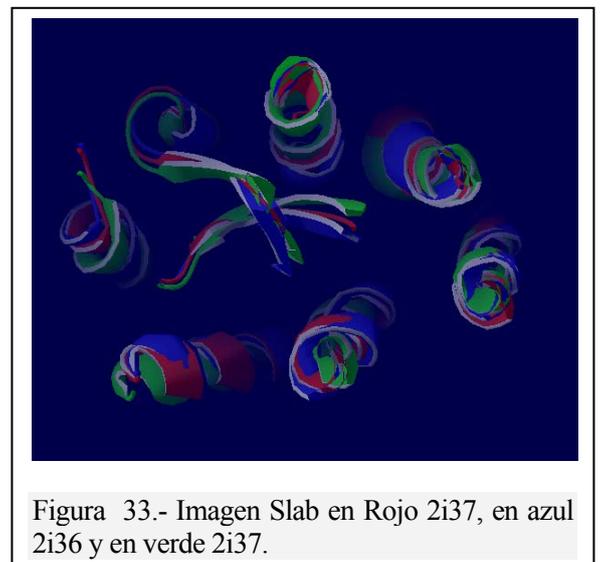
Los cambios estructurales que se pueden producir son mínimos., de hecho la recuperación del complejo original es un proceso que puede tardar horas.



Los métodos de simulación molecular poco pueden aportar con tiempos de respuesta tan cortos (véase el artículo de (Tomasello et al., 2009)), ya que se entra en lapsos de tiempo en donde la mecánica clásica deja de tener validez. La foto-activación del retinal y su cambio isomérico ocurren antes de que la rodopsina entre en estado activado, posteriormente y en un espacio de tiempo más largo se activa la rodopsina y se transduce la señal.

Como advierte el resumen de pdb, son pocos los cambios estructurales, más bien mínimos, y parece ser que los cambios mayores tienen lugar entre los dímeros de rodopsina de las membranas.

Aun así en Figura 32, es posible comprobar como existe un pequeño desplazamiento en las hélices, que es



el que marca la diferencia entre la rodopsina inactiva y activa. La siguiente estructura en la serie fisiológica es la opsina (rodopsina libre de ligando 3CAP).

La opsina tiene una estructura más cercana a la forma activa que a la inactiva (Figura 33). Esta opsina recibirá a un ligando (retinal) para convertirse en la forma inactiva.

Las imágenes del artículo de (Scheerer et al., 2008) son bastante explicitas, en cuanto los cambios estructurales que acontecen.

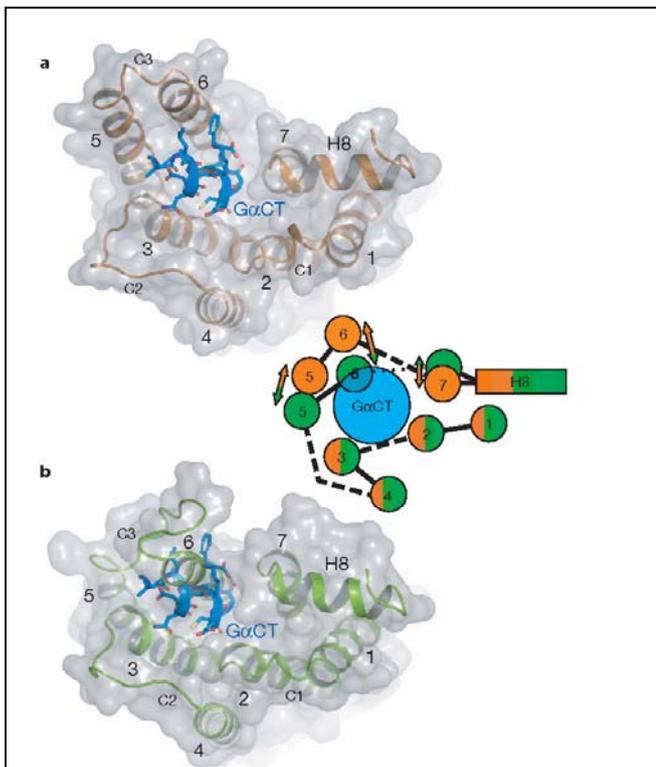


Figure 2 | Comparison of Ops*–GαCT and dark-state rhodopsin structures.
a, View from the cytoplasm of Ops*–GαCT. Ops* is shown in ribbon (orange) and surface (grey) representation, the Gα_i(340–350)K341L peptide (ILENLKDCGLF) is shown as a ribbon and stick model (blue). The angle between the helical axis and the membrane normal ($43 \pm 2^\circ$) is in good agreement with predictions from residual dipolar coupling NMR data²⁹.
b, The view from the cytoplasm of dark-state rhodopsin (PDB accession 1U19; green ribbon and grey surface) and superposed GαCT (blue) is shown. The scheme indicates differences in the arrangement of TM1–TM7 between Ops*–GαCT (Ops*, orange; GαCT, blue) and dark-state rhodopsin (green).

Figura 34 .- Comparación de la Opsina activa y las Rodopsinas inactivas. Fuente :

1. La hélice 6 se desplaza hacia fuera del paquete de hélices.
2. la hélice acompaña a la 6 en el movimiento.
3. La hélice 7 se desplaza hacia la 2.
4. Las helices 3 y 5 rotan en sentido antihorario, y las 4 y 6 en sentido horario.

Aparte de los cambios estructurales, el conglomerado de puentes de hidrógeno entre los residuos altamente conservados (55 83 y 302, son los encargados de estabilizar el paquete), mientras que en el estado activo es únicamente el par 55 83.

Igualmente el puente los puentes iónicos entre los residuos 135 y 247 se rompen, y el residuo 265 cambia de conformación.

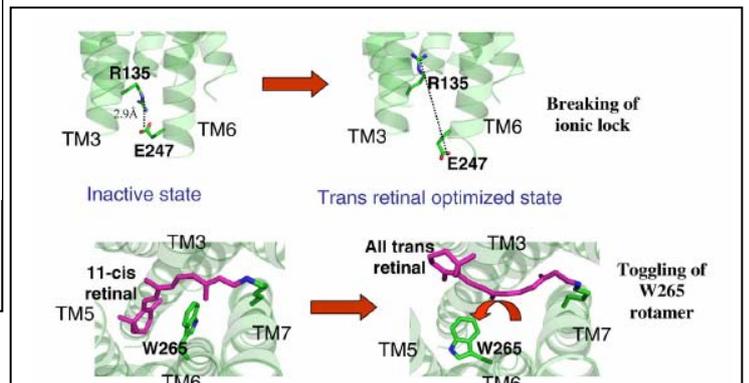


Fig. 1. Known conformational switches in rhodopsin. The ionic lock and the rotamer (W265) toggle switch.

Figura 35.- Cambios de conformación con la activación. Fuente (Bhattacharya et al., 2008)

4.5 Entendiendo el estado activo e inactivo de los receptores.

La principal aportación de la biología estructural a la biología de sistemas viene de la mano de los estados activo e inactivo de los receptores. Hemos visto que las GPRCs son elementos “plásticos” con un esqueleto homologo, y que cambian de conformación al enlazarse o acomplejarse con sus ligandos. Esto último es exactamente así, las últimas investigaciones has demostrado dos hechos fundamentales:

1. Los GPCRs se pueden encontrar en estado activo o inactivo sin necesidad de estar unidos al ligando.
2. La activación del receptor por el ligando no es un solo proceso, sino una serie de procesos secuenciales que suponen cambios paulatinos de conformación.

Por ejemplo (Bhattacharya et al., 2008) mediante una combinación del método LITiCon y simulaciones de mecánica molecular proponen el siguiente mecanismo de activación.

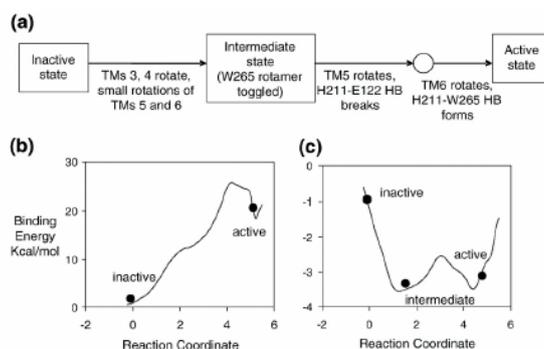


Fig. 11. (a) Proposed activation pathway for bovine rhodopsin, (b) ligand binding energy as function of reaction coordinate for 11-*cis* retinal, (c) ligand binding energy with reaction coordinate for all-*trans* retinal. The energy values are in kilocalories per mole and are with respect to the binding energies of the respective ligands in the inactive conformation of the receptor.

Figura 36.- Modelo de activación de la rodopsina propuesto por (Bhattacharya et al., 2008)

Los cambios secuenciales de la estructura son difíciles de apreciar en el perfil de energías de la Figura 35, pero en una representación de la energía frente al movimiento relativo de las hélices es posible comprobar como se forma una estructura intermedia y se rompe la barrera de potencial.

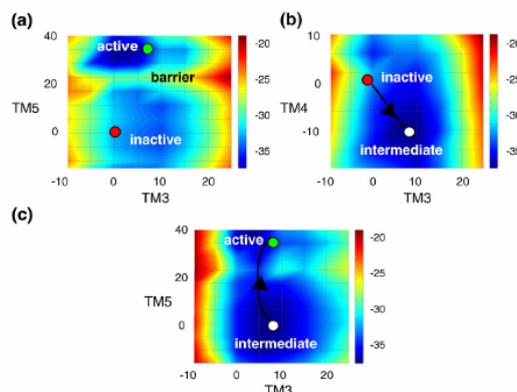


Fig. 10. Binding energy landscape for all-*trans* retinal (a) TM3-5 movement, (b) TM3-4 movement, (c) TM3-5 movement when TMs 3 and 4 have rotated to the intermediate state.

Figura 37.- formación de una estructura intermedia durante la activación de la rodopsina. Fuente: (Bhattacharya et al., 2008)

La activación de un receptor por un fármaco agonista o la inactivación por uno antagonista se puede entender como una modificación de las barreras de energía que separan ambas estructuras. En el artículo de (Kobilka and Deupi, 2007) se plantean diversas posibilidades:

El estado basal del receptor es inactivo, el valle más profundo en la línea punteada de la imagen b de la Figura 38), tras la unión con un agonista se modifica el perfil de energía del receptor de forma que el estado activo pasa a tener un valle más profundo que el estado inactivo.

En la imagen b de la Figura 38, un antagonista se une al receptor y modifica el perfil de energía estabilizando el estado inactivo y desestabilizando el estado activo, como consecuencia, la barrera que separa a ambos estados es mayor.

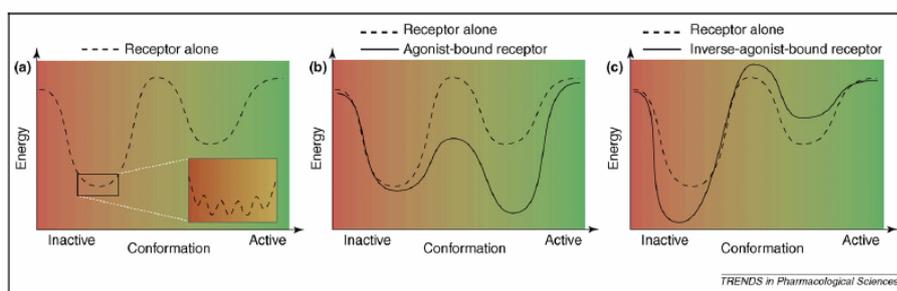


Figure 1. Theoretical energy landscape of a GPCR. (a) Conformational states of an unbound GPCR. (b) Binding of an agonist or partial agonist lowers the energy barrier and/or reduces the energy of the more active conformation relative to the inactive conformation. (c) Binding of an inverse agonist increases the energy barrier and/or reduces the energy of the inactive state conformation relative to the active conformation.

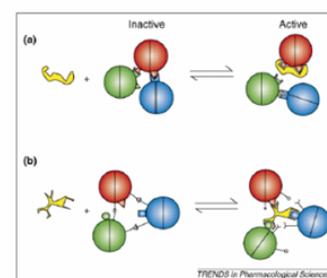


Figure 3. Possible mechanisms by which agonist binding disrupts intramolecular interactions that stabilize the inactive state. (a) The agonist binds directly to amino acids involved in stabilizing the inactive state. (b) Agonist binding stabilizes a new set of intramolecular interactions.

Figura 38.- Perfiles de energía de activación y desactivación del receptor por un fármaco. Fuente: (Kobilka and Deupi, 2007)

4.6 Modelado computacional por homología de los GPCRs

A partir de estas estructuras (y junto con el β_1 adrenérgico y A_{2A} de adenosina), hay que modelar el resto de GPCRs. Para modelar una proteína hay tres métodos: Homología, threading y ab-initio (folding). Normalmente, en el caso de los GPCRs este proceso se hace por homología, tomando como plantillas las estructuras de la rodopsina y aprovechando que todas las GPCRs tienen un dominio estructural casi idéntico (comprobado por microscopía).

El review de Panty (Patny et al., 2006), proporciona una extensa explicación sobre las claves de modelar una estructura de GPCR por homología. Como veremos más adelante no es un proceso sencillo, pero las herramientas de software actuales facilitan la tarea.

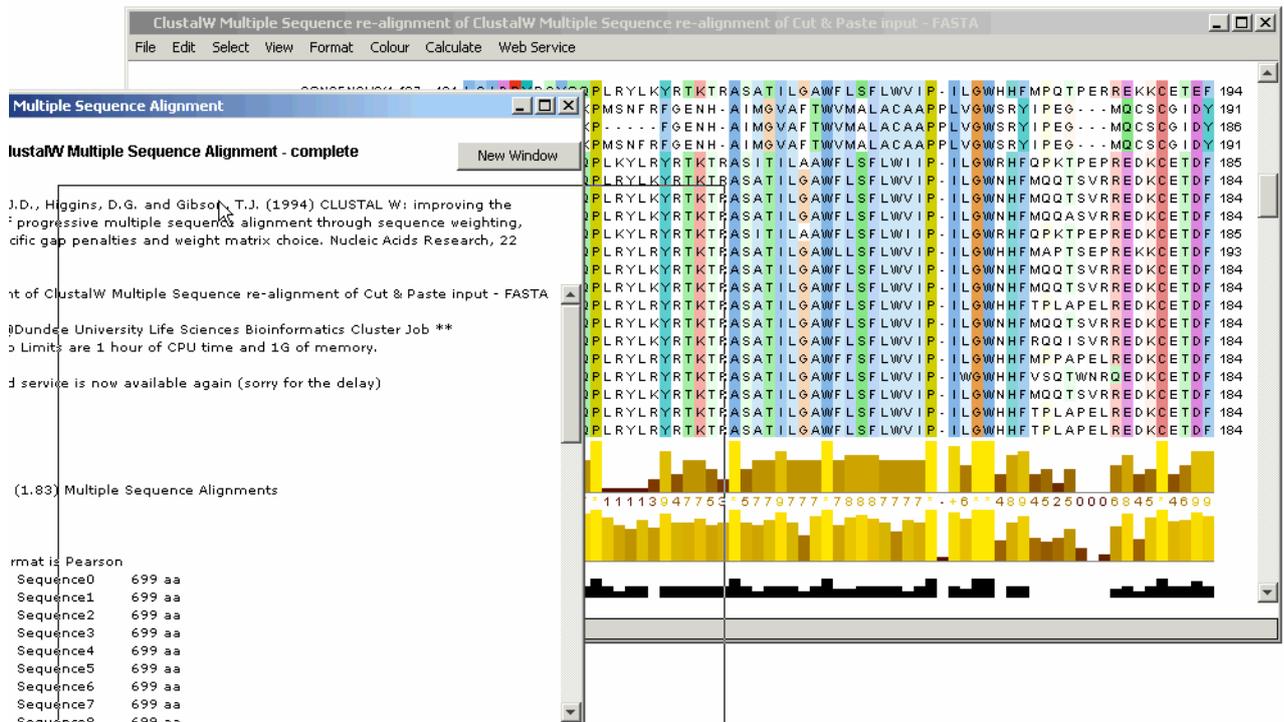
Los pasos estándar a seguir son los siguientes:

4.6.10 Asignación provisional de la estructura secundaria y selección de la plantilla.

El proceso de asignación provisional de la estructura secundaria, consiste en realizar un alineamiento o búsqueda de proteínas con estructura conocida en el PDB (Protein Data Bank), o en SCOP, DALI o CATH. Se trata de identificar un conjunto de posibles candidatos a plantilla o patrón de nuestra proteína objetivo.

Este proceso en el caso de los GPCRs es sencillo, el patrón será la rodopsina, pero se puede probar por si existiera alguna proteína similar en otra de las familias.

Posteriormente hay que realinear toda la familia con la Rodopsina, o con el patrón. Desde el mismo alineamiento de familia de GPCRDB se puede hacer esto mismo, o bien descargarlo y usar cualquier otro programa.



Hay que asignar las zonas del alineamiento a las hélices de la estructura de 7M haciéndolas coincidir con las de la Rodopsina. Igualmente desde JalView se puede hacer este proceso de diferentes maneras: Poniéndolas nosotros mismos a mano, mediante el diagrama de hidrofobicidad, rescatando las anotaciones de otras bases de datos, o usando la funcionalidad de JNet implementada en JalView.

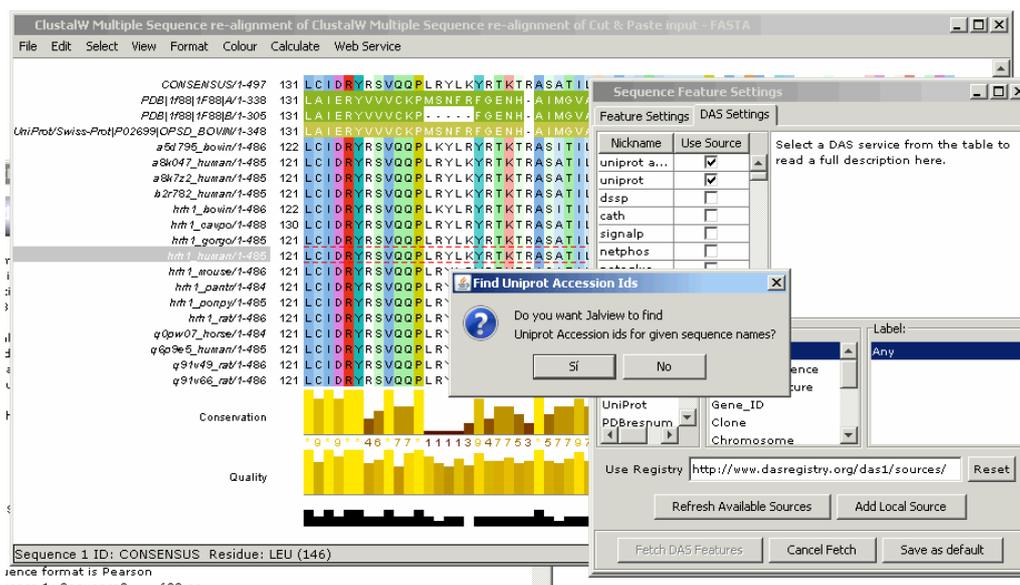


Figura 41.- Rescatando las anotaciones de uniprot con Jalview

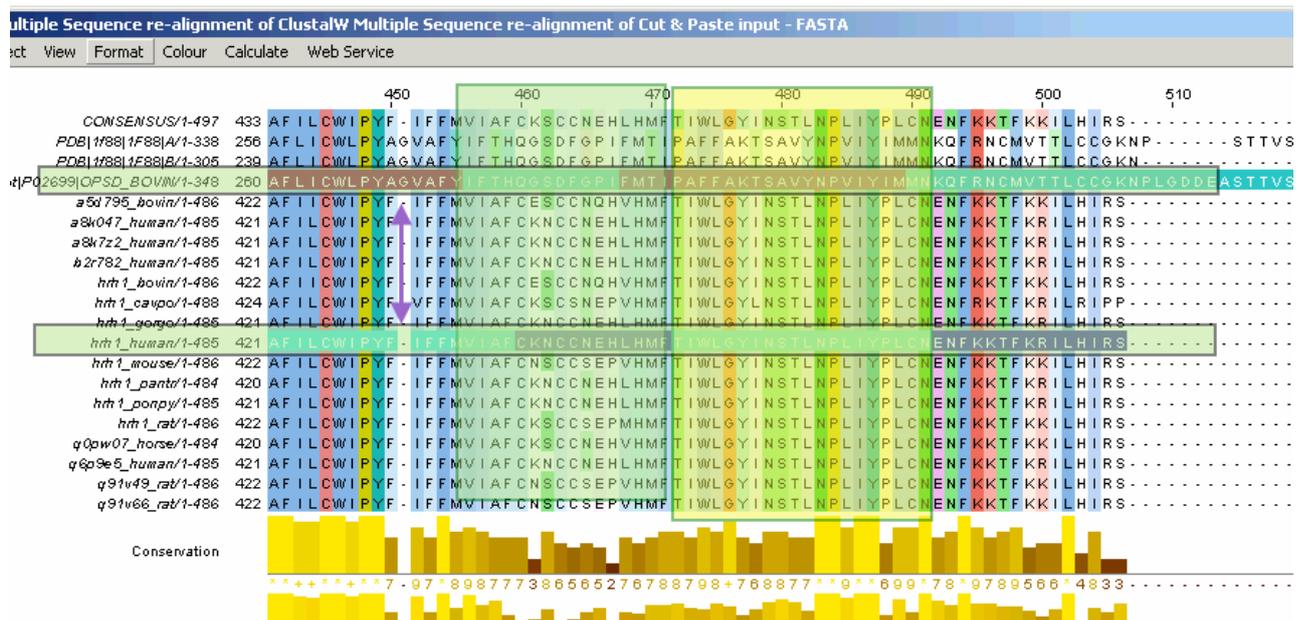


Figura 42.- Buscando las zonas comunes mediante las anotaciones de Uniprot en JalView.

4.6.12 Modelando las zonas estructuralmente conservadas.

En este proceso se pasan los datos del alineamiento y el patrón al software de modelado para que construya los primeros modelos. Algunos de los programas más utilizados son: COMPOSER, CONGEN, MODELLER, SYBYL; pero también hay innumerables servidores de modelado como WHAT IF, SWISS-MODEL, HOMMER, etc.

Como resultado el software nos devolverá una o varias estructuras alineadas estructuralmente con el patrón.

4.6.13 Modelado de las zonas variables.

Las zonas no alineadas originalmente deben ser reconstruidas mediante threading, con ab-initio holding, o bien mediante mecánica molecular. Muchos de los paquetes de modelado (y de docking) disponen de utilidades para hacer estas tareas. Hay servidores específicos para modelar los loops, como LOBO (<http://protein.cribi.unipd.it/>), WLOOP (<http://smi.snv.jussieu.fr/wloop/>), RAPPER (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/>), MODLOOP (<http://modbase.compbio.ucsf.edu/modloop/modloop.html>). El proceso pasa por enviar al servidor o al programa, la estructura y un fichero con los trozos que queremos modelar. El resultado será una estructura con la estructura de los loops optimizada.

4.6.14 Refinado del modelo

El refinado consiste en someter a la estructura a un proceso de dinámica molecular a efectos de que se relajen todos los enlaces con problemas estéricos. Los campos de fuerzas que se suelen utilizar son AMBER, CHARMM, OPLS/OPLS-AA, CVFF, CFF9, GROMACS, GROMOS, TRIPOS, en definitiva cada programa tiene uno o varios protocolos implementados.

Normalmente los servidores de modelado devuelven la estructura refinada. Y por ejemplo en el caso de HOMMER realizan los tres últimos pasos como un solo protocolo.

4.6.15 Validación del Modelo

Una vez obtenida la estructura hay que comprobar que es correcta. Para ello disponemos de gráficos de Ramachadran, gromos, etc. Por ejemplo, desde el servidor de SWISS-MODEL podemos checkear una estructura con todas las técnicas comunes.

**Workspace Tools:****Template Identification**

Tools for searching the SWISS-MODEL template library for suitable template structures.

Sequence Feature Scan

Tools for secondary structure prediction, prediction of disordered regions, and assignment of domains in the target sequence.

Structure Assessment

Tools for protein structure and model assessment: structure quality checks and secondary structure assignment.

SwissModel Template Library (ExPDB)

Lookup template structure information by PDB-ID.

Local Model Quality Estimation:

- ProQRes  Per-residue model accuracy estimation
- Anolea  Anolea atomic mean force potential
- Gromos  Empirical force field

Global Model Quality Estimation:

- QMEAN  Composite scoring function for model quality estimation
- DFire  All-atom distance-dependent statistical potential

Stereochemistry Check:

- Whatcheck  Protein structure verification
- Procheck  Stereochemical quality check; min. Resolution: Å

Structural Features:

- DSSP  Secondary Structure, geometrical features, and solvent exposure assignment
- Promotif  Analysis of protein structure motifs

Figura 43.- Herramientas de validación del modelo.

4.7 Diseño y búsqueda de fármacos resultantes de los estudios estructurales de la rodopsina

Todas estas metodologías de modelado a partir de las estructuras de la rodopsina tienen como objetivo final desarrollar “mejores” fármacos. El proceso mediante el cual se puede generar un nuevo medicamento es realmente complicado, y no es únicamente un problema computacional. Las técnicas experimentales son las que marcan el camino y la diferencia entre un buen fármaco y otro malo.

El mayor coste para desarrollar un fármaco es el testeo mediante prueba y error de posibles candidatos, y es aquí en donde las técnicas bioinformáticas pueden acelerar y abatar el proceso, mediante el docking molecular de fármacos en los modelos generados a partir de la estructura de la Rodopsina.

Por ejemplo, con el alineamiento de la Figura 42, he generado en HOMMER un modelo en menos de 10 minutos,

Homology Modeling with HOMER
Manual template search - Version 1.5

Title: hrh1_human
emailaddress: ramon.tamarit@telefonica.net
pid: 1794714931

Status: finished

NB: The data will be kept for two weeks, after which it will be deleted without further notice.

Available files:

Input parameters:	HTML
Final model:	PDB
Transcript of the modelling session:	HTML
FRST energy profile of the modeled structure:	TEXT PDF

HOMER output:

FRST output:

```

Calculating energy over residues from 1 to 301.
Rapid energy = -3071.47 [avg = -10.2382 per AA]
Solvation energy = 10.4215 [avg = 0.0347384 per AA]
Mainchain hydrogen bonds = 255
Torsion energy = 19.7235 [avg = 0.065745 per AA]
Composite FRST energy = 4435.3144 [avg = 14.784381 per AA]
  
```

Jmol Visualization options

Display: Spin:

View Jalview alignment:

(c) Silvio Tosatto for Biocomputing UP, 01/2006

Figura 44.- Modelo generado mediante HOMMER para HRH1 con la estructura 1f88 de la rodopsina.

Con este simple modelo, podemos hacer docking, con un antagonista común de de HRH1 obtenido de la base de datos IUPHAR (<http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorDisplayForward?receptorID=2303>). En cinco minutos más hemos colocado al ligando en su sitio de unión mediante Molegro, Figura 45 (un software de Docking molecular).

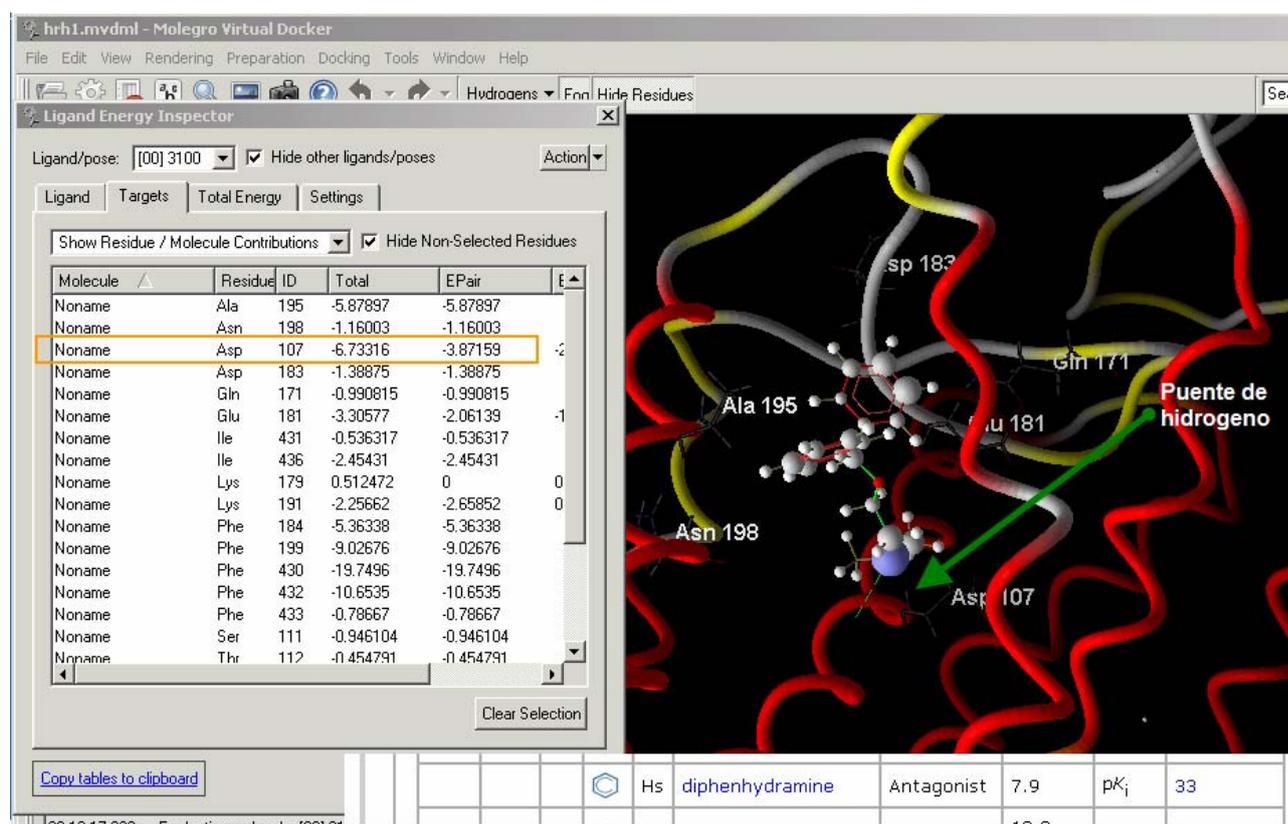


Figura 45.- Docking de la difenilhidramina sobre el HRH1 con molegro. Ejemplo extraído de (Saxena et al., 2008). Señalado el residuo “guía” indicado en la bibliografía.

Seguidamente podemos buscar en las bases de datos de ligandos todos los parecidos a este, o incluso generar nuevos compuestos capaces de interactuar más con el HRH1. Por ejemplo en Pubchem (Figura 46)

Mediante todo este proceso iterativo es posible acelerar en gran medida, y con muy bajo coste, la búsqueda de nuevos fármacos. El proceso completo se resume en la Figura 47.

The screenshot shows the PubChem Compound search results for diphenhydramine. The search results are displayed in a table with the following columns: All, BioAssay, Protein3D, and Rule of 5. The total number of results is 419. The chemical structure of diphenhydramine is shown, along with its IUPAC name, molecular weight, and bioassay data.

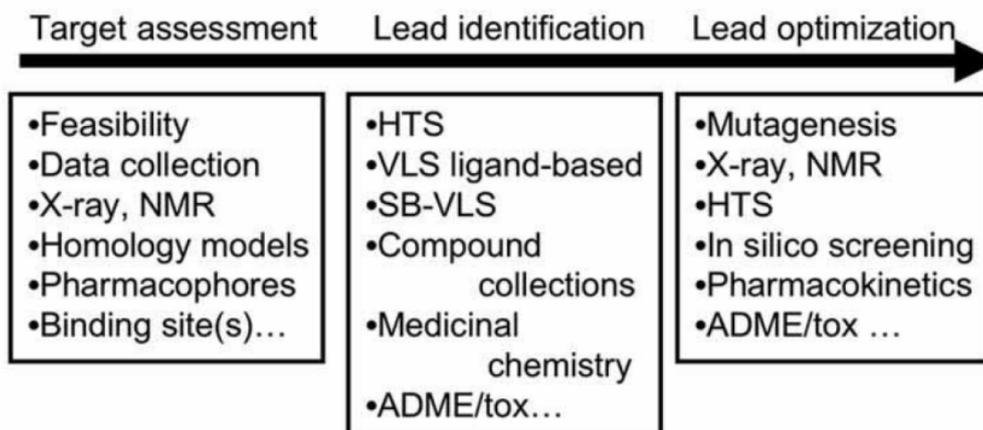
Chemical structure: CN(C)CC(Oc1ccc(cc1)C2=CC=CC=C2)C3=CC=CC=C3

IUPAC: 2-benzhydryloxy-N,N-dimethylethanamine
 MW: 255.354740 g/mol | MF: C₁₇H₂₁NO

Tested in BioAssays: All: 141, Active: 53, BioActivity Analysis
 Anti-Allergic Agents... more

Figura 46.- Compuestos similares a difenilhidramina en PubChem

1a)



1b)

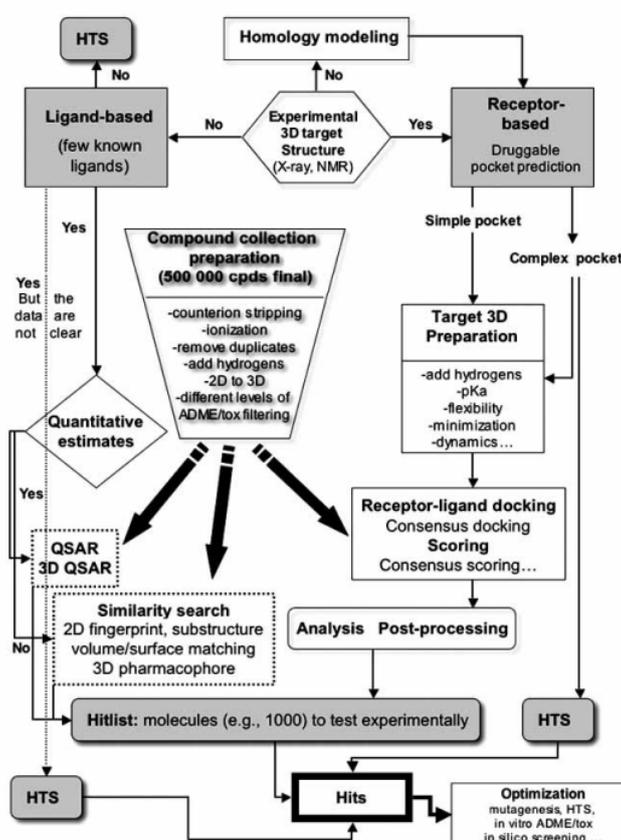


Fig. (1a). Some key steps in the Drug discovery process. (1b). VLS-HTS flowchart: combining in silico screening and experimental HTS for hit finding. Summary of an early-phase discovery project with several possible routes: if the receptor 3D structure is known, SB-VLS can be applied, if only one or some ligands are known, then ligand-based approaches can be used. If no data are available, HTS can be applied and followed by additional ligand based and/or SB-VLS (in case the 3D structure appeared during the HTS step), further continued with experimental screening and ADME-tox and pharmacokinetics optimization. In some situations, a ligand might be known or the 3D structure of the receptor would be known, but yet it is not possible to use in silico screening methods. For example, the 3D structure of a target is known but the binding pocket can not be defined or is too flat... In these cases, it is preferable to initiate HTS experiments and continue by combining experimental and in silico design approaches.

Figura 47.- Proceso integral de diseño de fármacos. Extraído de (Villoutreix et al., 2007)

4.8 Herramientas y recursos libres para el análisis de la interacción ligando-GPCR

Hay especialmente un artículo que habla por sí solo de la importancia del modulado molecular de proteínas y fármacos, es (Villoutreix et al., 2007) “Free resources to assist structure-based virtual ligand screening experiments”. Es una extensa (30 páginas) y ordenada recopilación de “todas” y cada una de las herramientas libres que hay disponibles en Internet, junto con su link, para el desarrollo de fármacos.

Las herramientas y recursos están ordenadas por utilidad:

1. Toolkits de diseño y visualización molecular
2. Predicción de toxicidad de fármacos
3. Colecciones de ligandos para screening, y utilidades para manejar estas bases de datos
4. Herramientas para la predicción de las cavidades y los sitios de unión
5. Bases de datos de fármacos y ligandos
6. Bases de datos de proteínas
7. Herramientas de modelado y análisis de proteínas (validación)
8. Software de docking

Me remito a este fabuloso artículo en lo relativo a los recursos disponibles....¡¡¡que son muchos!!!

Casos prácticos

Aplicaciones bioinformáticas de modelado de GPRCs

5 Modelado por homología del dominio 7M de los receptores metabotrópicos del Glutamato.

5.1 Introducción y de artículos de base

Durante este texto, no hemos hablado de esta importante familia C de GPCRs (receptores metabotrópicos del Glutamato o mGLUR), sin embargo juegan un importante papel en innumerables sistemas fisiológicos en: la plasticidad sináptica en otros procesos neuro-fisiológicos y por supuesto en las patologías derivadas. A diferencia del resto de GPCRs, se caracterizan en particular por:

- poseer un largo y estructurado extremo N-Terminal de aproximadamente 500 aminoácidos.
- el sitio de unión del Glutamato se sitúa en el dominio extracelular (ver figura)

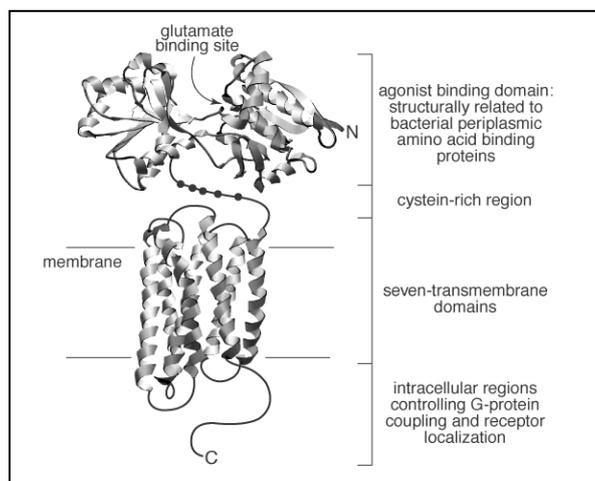


Figure 1. General structure of metabotropic glutamate receptors.

Figura 48.- Estructura de los “metabotropic glutamate receptors”. Fuente: <http://www.iuphar-db.org/GPCR/IntroductionDisplayForward?chapterID=1285>

Sin embargo, existen muchos estudios de SDM que demuestran que muchos ligandos pueden interactuar con el dominio transmembrana (7M) actuando como moduladores alóstericos más que como agonistas o antagonistas clásicos. (N.Barton and F.E.Blaney, 2007).

La familia de los mGLUR [http://en.wikipedia.org/wiki/Metabotropic glutamate receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/Metabotropic_glutamate_receptor) se clasifica en tres grupos, siendo los más importantes los del Grupo I.

Overview of glutamate receptors							
Family	Receptors ^{[9][10]}	Gene	Mechanism ^[9]	Function	Agonists & Activators	Antagonists	Synapse site
Group I	mGluR ₁	GRM1	G _q , ↑Na ⁺ ^[5] , ↑K ⁺ ^[5] , ↓glutamate ^[8]	<ul style="list-style-type: none"> • Increase ^{[11][12]} NMDA receptor activity and risk of excitotoxicity 	<ul style="list-style-type: none"> • 3,5-dihydroxyphenylglycine 		mainly postsynaptic ^[13]
	mGluR ₅	GRM5	G _q , ↑Na ⁺ ^[5] , ↑K ⁺ ^[5] , ↓glutamate ^[8]				
Group II	mGluR ₂	GRM2	G _i /G _o	<ul style="list-style-type: none"> • Decrease ^[14] NMDA receptor activity and risk of excitotoxicity • Attenuate schizophrenia 	<ul style="list-style-type: none"> • eglumegad • Biphenylindanone A • DCG-IV 	<ul style="list-style-type: none"> • APICA • EGLU • LY-341,495 	mainly presynaptic ^[13]
	mGluR ₃	GRM3	G _i /G _o				
Group III	mGluR ₄	GRM4	G _i /G _o	<ul style="list-style-type: none"> • Decrease ^[14] NMDA receptor activity and risk of excitotoxicity 	<ul style="list-style-type: none"> • L-AP4 		mainly presynaptic ^[13]

Tabla 5.- Tipos de receptor del glutamato. Fuente: [http://en.wikipedia.org/wiki/Metabotropic glutamate receptor#Overview](http://en.wikipedia.org/wiki/Metabotropic_glutamate_receptor#Overview)

Son escasas las referencias bibliográficas que estudien el modelado del dominio 7M., sin embargo el artículo de (Malherbe et al., 2003). (<http://www.jbc.org/cgi/reprint/278/10/8340>), describe la construcción de un modelo del receptor metabotrópico de glutamato 1 (mGLUR1 en adelante).

La modelización de esta serie de receptores ha supuesto un importante avance en el desarrollo de fármacos como por ejemplo: CPCOEt, BAY36-7620, RO 67-7476, RO 01-6128 y RO 67-4853, que actúan como reguladores positivos y negativos del mGLUR1 y mGLUR5 (Yanamala et al., 2008).

En este caso práctico discutiremos los modelos de mGLUR1, generados por homología en los artículos de (Malherbe et al., 2003) y (Yanamala et al., 2008). Con especial atención al primero de ellos.

5.2 Descripción del artículo de Malherbe. "Mutational analysis and molecular modeling of the allosteric binding site of a novel, selective, noncompetitive antagonist of the metabotropic glutamate 1 receptor"

El artículo de Malherbe es el típico estudio experimental de SDM en el que se emplean técnicas bioinformáticas para construir un modelo tridimensional del receptor mGLUR1 y realizar hipótesis sobre el sitio de unión del mismo con ligandos con actividad conocida. Como ocurre con todos los GPCRs no disponemos de una estructura cristalina resuelta (a excepción de los casos que hemos visto anteriormente) para plantear hipótesis de trabajo sobre el sitio de unión y el mecanismo molecular de acción de los fármacos.

Para construir su modelo de mGLUR1 seleccionan como plantilla la estructura cristalina de la Rodopsina Bovina (**1F88**). Hay que recordar que en el momento del estudio de Malherbe era la única disponible. El proceso de construcción fue el siguiente:

1. Alineamiento del dominio transmembrana de la secuencia de mGLUR1 que rescataron de swiss-prot (<http://www.expasy.ch/uniprot/P23385>) con la secuencia contenida en el pdb **1F88** de la rodopsina.

UniProtKB/Swiss-Prot entry **P23385**

[Entry info] [Name and origin] [References] [Comments] [Cross-references] [Keywords] [Features] [Sequence] [Tools]

Note: most headings are clickable, even if they don't appear as links. They link to the user manual or other documents.

Entry information	
Entry name	GRM1_RAT
Primary accession number	P23385
Secondary accession numbers	None
Integrated into Swiss-Prot on	November 1, 1991
Sequence was last modified on	November 1, 1991 (Sequence version 1)
Annotations were last modified on	July 28, 2009 (Entry version 97)
Name and origin of the protein	
Protein name	Metabotropic glutamate receptor 1 [Precursor]
Synonym	mGluR1
Gene name	Name: Grm1
	Synonyms: Gprc1a, Mglur1
From	Rattus norvegicus (Rat) [TaxID: 10116]
Taxonomy	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus.
Protein existence	1: Evidence at protein level.
References	

Figura 49.- Entrada de uniprot de mGLUR1 de rata

2. Emplearon el paquete de modelado Moloc (<http://www.moloc.ch/>) para generar el modelo de la mGLUR1 a partir del alineamiento y de la estructura de la rodopsina. Como vemos, actualmente el paquete de cálculo dispone de todas las herramientas necesarias para generar y optimizar estructuras de receptores.

3. Optimizaron los loops extracelulares mediante dinámica molecular (con el campo de fuerzas implementado en Moloc). Este paso realmente consistió en dos, optimizado de la estructura de C-alfa y posteriormente minimización de los residuos.
4. La calidad del modelo se comprobó mediante las utilidades de Moloc (no especifican el método en el artículo).
5. Emplean docking molecular con el ligando EM-TBPC para comprobar si el sitio de unión coincide con el de la rodopsina.

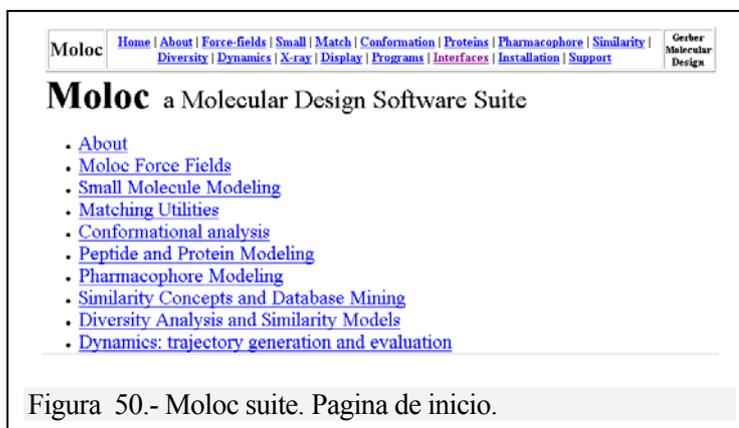


Figura 50.- Moloc suite. Pagina de inicio.

La hipótesis de trabajo que plantean es que a pesar de la distancia evolutiva entre la Rodopsina Bovina y la mGLUR1 de rata se pueden construir modelos de homología usando como plantilla la estructura de la rodopsina. Suponen que el sitio de unión del ligando EM-TBPC será similar.

Dejando a parte los estudios bioquímicos del artículo, nos centraremos en los resultados experimentales. Estos se pueden resumir en la figura que presentan y en el resumen de la tabla de interacciones:

En la figura (Figura 51) se observa la disposición espacial que adopta el ligando en el supuesto sitio de unión. A simple vista comprobamos que el sitio de unión es similar al que hemos visto de la Rodopsina, pero no igual. En este caso el ligando sube casi paralelo a las hélices 6 y 7 (gris y magenta), mientras que el retinal en la rodopsina se orienta perpendicular a las hélices.

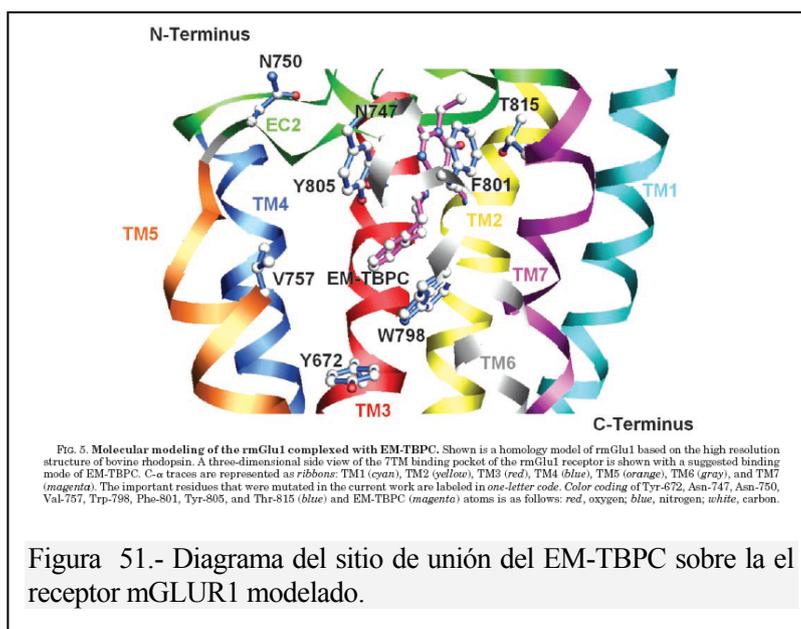


Figura 51.- Diagrama del sitio de unión del EM-TBPC sobre la el receptor mGLUR1 modelado.

En la tabla (Figura 52) comparan los resultados obtenidos con su modelo con los obtenidos con otros modelos existentes. Para esta comparación utilizan el sistema de numeración de Ballesteros (numeración relativa del residuo respecto del residuo mejor conservado de la familia en la hélice transmembrana). En la tabla comprobamos que la numeración relativa coincide en todos los casos con los equivalentes de la rodopsina.

Comparison of ligand-binding pocket of mGlu1 allosteric antagonist with those of rhodopsin-like GPCRs

The 17 residues located at a distance of 4.5 Å from *cis*-retinal in the three-dimensional structure of rhodopsin are shown (23, 32, 34). The generic numbering system proposed by Ballesteros and Weinstein (24) was used to compare residues in the 7TMD of the different GPCRs. The residues that have been experimentally determined to be located in the binding sites are as follows: epinephrine of h β_2 -adrenergic receptor (R) (33), hA $_3$ receptor ligand recognition (35), antagonist GR113808 ([1-[2-(methylsulfonylamino)ethyl]-4-piperidinyl]methyl-1-methyl-1H-indole-3-carboxylate) of h5HT $_4$ receptor (36), and inverse agonist of h5HT $_4$ receptor (37).

	Rhodopsin <i>cis</i> -retinal	mGlu1 α EM-TBPC	h β_2 -adrenergic R epinephrine	hA $_3$ adenosine R ligand recognition	h5HT $_4$ R GR113808	h5HT $_4$ R inverse agonist
TM3			Asp-113 ^{3.32}		Asp100 ^{3.32}	Asp100 ^{3.32}
	Glu-113 ^{3.28} Ala-117 ^{3.32} Thr-118 ^{3.33} Gly-121 ^{3.36} Glu-122 ^{3.37}			His-95 ^{3.37}		
EC2				Lys-152		
	Glu-181 ^{4.44} Ser-186 ^{4.49} Tyr-191 ^{4.54}					
TM5			Ser-203 ^{5.42} Ser-204 ^{5.43} Ser-207 ^{5.46} Phe-208 ^{5.47}		Ser-197 ^{5.43}	
	His-211 ^{5.46} Phe-212 ^{5.47}	Val-757 ^{5.47}				
TM6			Trp-286 ^{6.48}	Trp-243 ^{6.48} Leu-244 ^{6.49}		Trp-272 ^{6.48}
	Phe-261 ^{6.44} Trp-265 ^{6.48}	Trp-798 ^{6.48}	Phe-289 ^{6.51} Phe-290 ^{6.52} Asn-293 ^{6.55}	Ser-247 ^{6.52} Asn-250 ^{6.55}	Phe-275 ^{6.51} Phe-276 ^{6.52} Asn-279 ^{6.55}	Phe-275 ^{6.51}
	Tyr-268 ^{6.51} Ala-269 ^{6.52} Ala-272 ^{6.55}	Phe-801 ^{6.51} Tyr-805 ^{6.55}				
TM7						
	Ala-292 ^{7.89}	Thr-815 ^{7.89}				

Numeración de Ballesteros

Figura 52.- Residuos que interaccionan con el ligando en diferentes GPCRs. En amarillo se indica la posición relativa respecto del mejor conservado.

5.3 Construyendo un modelo de homología de mGLUR1 con Hommer

5.3.1 El objetivo: Obtener un modelo activado y desactivado de mGLUR1

Nos planteamos el siguiente objetivo, crear sendos modelos de mGLUR1 humana (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q13255>) (no de rata) uno activado y otro desactivado a efectos de posteriormente comparar los resultados de docking de nuestros modelos con los existentes en la bibliografía.

5.3.2 Comprobando la homología.

La construcción de un modelo de GPCR no es una tarea sencilla: Solo disponemos de unas pocas estructuras de partida que nos sirvan de plantilla (véase la Tabla 3.- Estructuras completas de GPCRs. Fuente: http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html), y la baja homología entre las familias de GPCRs es evidente.

El primer paso es comprobar la homología entre nuestro “target” y la plantilla o posibles plantillas. Para ello hacemos un alineamiento entre las secuencias del receptor A3AR, la estructura 3eml ([The 2.6 Å Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor bound to ZM241385](#)) y 2i36 ([Crystal structure of trigonal crystal form of ground-state rhodopsin](#)). Primero recuperamos las secuencias y las anotaciones de los dominios de uniprot con JalView. Las estructuras 2i36 y 2i37 las limpiamos con Swiss pdbviewer, dejamos una sola proteína, ya que los ficheros pdb 2i36 y 2i37 tienen tres cadenas y eliminamos los residuos de cristalización. En este paso hay que tener cuidado ya que en el pdb 2i37 a la cadena A le faltan residuos.

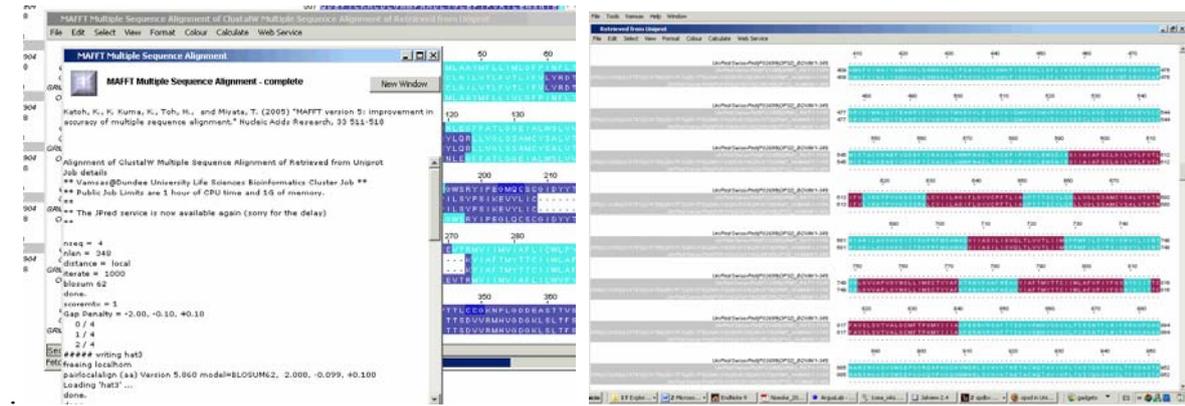


Figura 53.- Secuencias recuperadas con Jalview. Las zonas en granate son los dominios transmembrana anotados en uniprot.

El alineamiento lo hacemos con MAFFT (esta como opción en JalView y lo ajustamos a mano (para dejarlo como se indica en el artículo de Malherbe. El alineamiento fasta lo recuperamos de JalView Al final queda como en la figura:

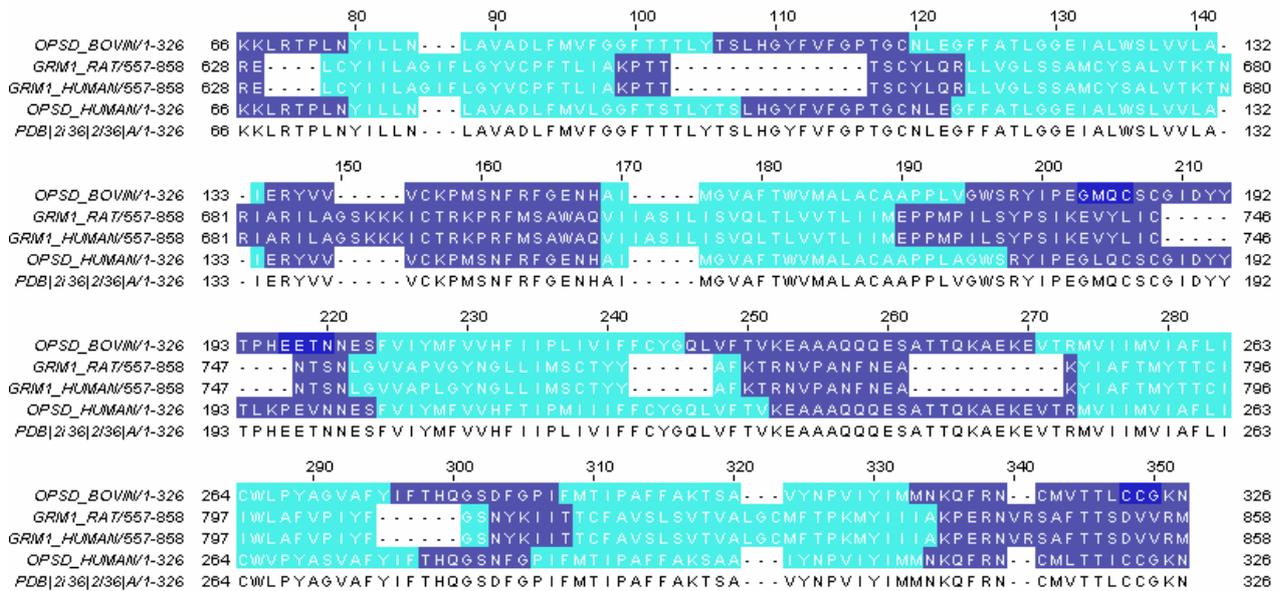


Figura 54.- Alineamiento de los homologos de mGLUR1 con las secuencias de 2i36 y la rodopsina.

La estructura se puede también modelar con la ayuda de uniprot:

The screenshot shows the UniProt search results for protein Q13255. The 'POSITIONAL FEATURES' section displays a feature map with columns for feature type, labels, feature annotations, and server names. A red box highlights the 'transmembrane region' prediction, which is annotated with 'MEMBRANE:595...' and 'Q13255 CHAIN...'. The feature map also shows other annotations like 'polypeptide domain', '0-phosphorylated L-serine', and '04'-phosphorylated'.

Figura 55.- Entrada de uniprot en donde se indica, la predicci3n de la prote3na.

<http://services.uniprot.org/uniprot-dasty/client/uniprot.php?q=Q13255&label=BioSapiens&t=3>

O tambi3n con Smart:

The screenshot shows the SMART database interface for the protein GRM1_HUMAN (Q13255). The 'SMART MODE' is set to 'NORMAL GENOMIC'. The protein domain map shows several transmembrane segments (blue vertical bars) and other domains (green and pink vertical bars). The protein is identified as 'Metabotropic glutamate receptor 1 precursor'.

Figura 56.- Entrada de Smart en donde se indica, la predicci3n de la prote3na. <http://smart.embl-heidelberg.de/smart/>

5.3.3 Modelando la estructura con HOMMER

Después de probar distintos servidores que generan modelos por homología y no obtener resultados adecuados, me decido por utilizar HOMMER, que un servidor que permite realizar todos los pasos en uno solo: Modelado de la estructura, modelado de los loops y optimización por dinámica molecular.

Como input HOMMER necesita el alineamiento en formato fasta y la plantilla, ver Figura 58.

Homology Modeling with HOMER
Manual template search - Version 1.5

Quick Help Examples References Server Statistics

General Informations
E-Mail address: _____ Name of sequence (optional): _____
E-mail notification of results:

Alignment (FASTA format, two sequences)
Order: target first template first
The alignment can be edited using Jvarkit and then pasted into the form on the right.
Launch Jvarkit
Paste Alignment

Options
Perform loop modeling:
Perform side chain placement: **Asegurarse de marcar esta opción**
Template file: Select a valid PDB ID: _____ -OR- Upload a file: _____
Chain ID (if present and not first in file): _____
Enter consulta Pasteblecer

69 Silvia Tosatto for Bioinformatics UF, 01 / 2006

Figura 58.- Página de input de HOMMER.

Homology Modeling with HOMER
Manual template search - Version 1.5

Title: Inactiva entera
resultaddress: sylvia.tosatto@ufes.br
url: 90056467

Status: finished
NB: The data will be kept for two weeks, after which it will be deleted without further notice.

Available files:
Input parameters: HTML
Final model: PDB
Transcript of the modelling session: HTML
FRST energy profile of the modeled structure: TEXT PDF

HOMER output:
FRST output:
Calculating energy over residues from 1 to 324.
Input energy = -4053.30 (avg = -13.4750 per AA)
Interaction energy = 250 0.8187 (avg = 0.00454 per AA)
Miscellaneous hydrogen bonds = 250 0.0023 (avg = 0.007332 per AA)
Torsion energy = 30.233 (avg = 0.09418 per AA)
Complete FRST energy = 362.233 (avg = 11.2993 per AA)

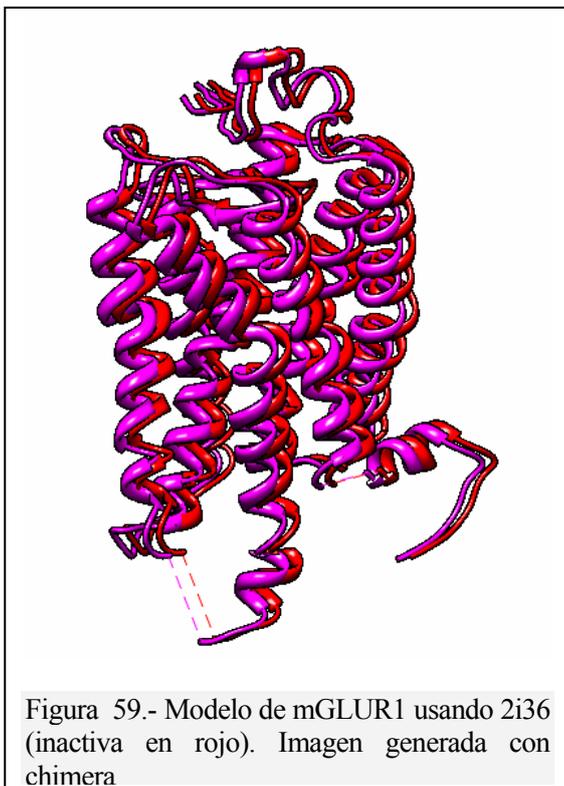
Jmol Visualization options
Display: Spin:
Template Model Model Quality On Off
View Jvarkit alignment: Alignment

69 Silvia Tosatto for Bioinformatics UF, 01 / 2006

Figura 57: Output de muestras de HOMMER

5.3.4 Visualizando los resultados.

En un rato el servidor nos envía, un mensaje indicando que el modelo se ha generado y que podemos recoger los datos. En la página de resultados tenemos: El fichero PDB con la estructura generada, y un informe sencillo de la optimización energética de la estructura. Desde misma página es posible visualizar tanto el modelo usado como plantilla como la imagen de la proteína generada.



Una vez descargados los ficheros pdb, podemos visualizar el resultado y compararlo con los correspondientes de Rodopsina.

El resultado de una de las estructuras se puede ver en la figura 41. tanto la estructura modelada con 2i36, como la modelada con 2i37 se superponen casi a la perfección con su homóloga. Por otra parte, una superposición de mGLUR1 activa y mGLUR1 inactiva, a simple vista tampoco nos ofrece grandes diferencias (Figura 59). Esto es debido a que 2i36 y 2i37 son también prácticamente iguales.

Una representación de cintas no ofrece la resolución necesaria cuando trabajamos con estructuras similares, pero si representamos únicamente el esqueleto de los modelos si que podemos apreciar ciertas diferencias en la estructura.

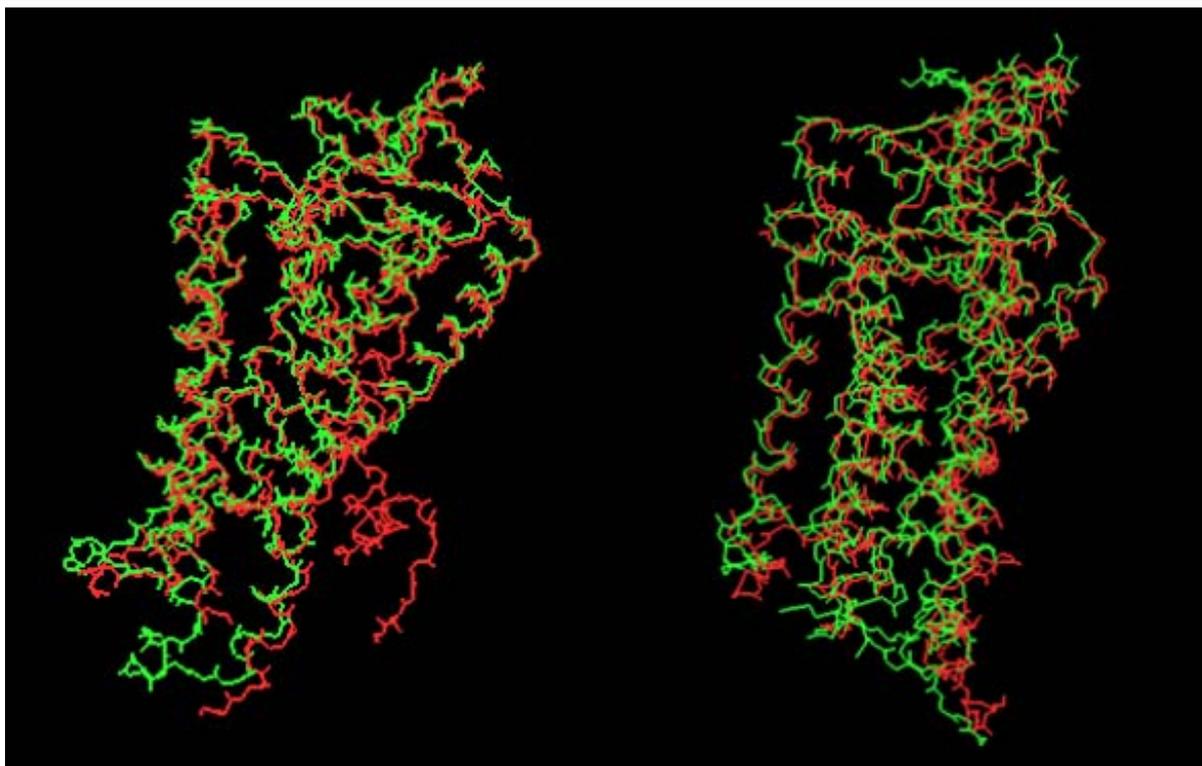


Figura 60.- A la izquierda mGLUR1_activa (en rojo) y mGLUR1_inactiva (en verde) superpuestas (Notese que a mGLUR1_activa le falta un trozo en la parte inferior, que se ha eliminado por que daba problemas al modelizarse en Swiss pdbViewer, no hay mayor problema, ya que el sitio de unión esta muy alejado y no va a influir en los resultados de docking). A la derecha (en una orientación similar) 2i36 (verde) y 2i37 (rojo).

En concreto, en la ampliación de la Figura 61 observamos como TM7 se ha desplazado hacia el exterior del paquete de hélices transmembrana (para mas detalles sobre los desplazamientos que ocurren en las hélices consultar (Wess et al., 2008).

En la siguiente imagen de chimera se pueden observar los desplazamientos de las hélices.

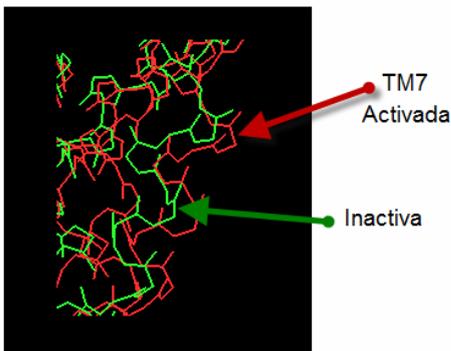


Figura 61.- Detalle de la hélice 7 (TM7)

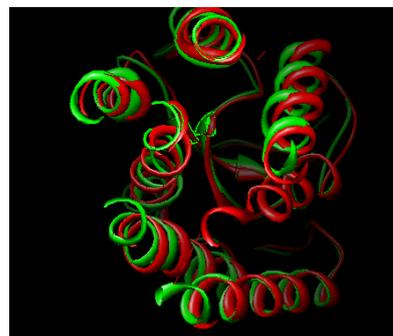


Figura 62.- Desplazamiento de las hélices por la activación. En rojo la forma activada, en verde la inactiva

Los cambios más importantes se producen en el sitio de unión de los ligandos. Lo que en un principio parecen pequeños cambio a nivel estructural como veremos a nivel energético puede ser importante.

5.3.5 Comprobando la estructura con Swiss - Model.

Mediante Swiss-Model podemos obtener diferentes análisis de la estructura a efectos de comprobar si es congruente y los problemas estéricos que presenta.

The screenshot shows the 'SWISS MODEL WORKSPACE' interface. At the top, there are navigation links: [Workspace] [Repository] [Modelling] [Tools] [General Info] [Links] [Help] [Settings] [logout]. Below this is a 'Workspace' section with a table of workunits:

Workunit	Type	Title	Status
P000021	Structure Assessment	homer_request_2i37_OK	finished
P000022	Structure Assessment	homer_request_2i36_OK	finished
P000023	Structure Assessment	2i36_inactiva	finished
P000024	Structure Assessment	2i37_activada	finished

Below the table is a legend for symbols:

- submission not finished (green circle with exclamation mark)
- queued (grey circle with exclamation mark)
- running (blue circle with exclamation mark)
- failed/stopped (red circle with exclamation mark)
- finished (green checkmark)
- 7 days left (green circle with '7')
- 1 days left (red circle with '1')
- will be deleted (red circle with 'X')
- keep 7 days longer (blue circle with '7')
- delete workunit (red circle with 'X')

At the bottom, the URL 'swissmodel.expasy.org/workspace' and '[SWISS-MODEL Team]' are visible.

Figura 63.- Espacio de trabajo de Swiss-Model.

En particular comprobaremos únicamente los diagramas de Ramachandran, y los compararemos con los de 2i36 y 2i37.

Procheck: top	mGLUR1 activa	No se incluyen los residuos que he recortado	Procheck: top	mGLUR1 inactiva
-----<<< P R O C H E C K S U M M A R Y >>>-----				
input_atom_only.pdb	2.5	292 residues	input_atom_only.pdb	2.5
* Ramachandran plot:	77.8% core 17.7% allow 3.2% gener 1.2% disall		* Ramachandran plot:	81.4% core 14.7% allow 3.2% gener 0.7% disall
* All Ramachandrans:	39 labelled residues (out of 290)		* All Ramachandrans:	28 labelled residues (out of 311)
+ Chi1-chi2 plots:	1 labelled residues (out of 156)		+ Chi1-chi2 plots:	3 labelled residues (out of 168)
+ Main-chain params:	5 better 0 inside 1 worse		+ Main-chain params:	5 better 0 inside 1 worse
Side-chain params:	5 better 0 inside 0 worse		Side-chain params:	5 better 0 inside 0 worse
* Residue properties:	Max.deviation: 11.0 Bond len/angle: 4.2 Morris et al class: 1 1 3	Bad contacts: 74	* Residue properties:	Max.deviation: 6.0 Bond len/angle: 3.5 Morris et al class: 1 1 3
+ G-factors	Dihedrals: -0.25 Covalent: 0.43 Overall: 0.02		+ G-factors	Dihedrals: -0.18 Covalent: 0.51 Overall: 0.10
M/c bond lengths:	99.8% within limits 0.2% highlighted		M/c bond lengths:	100.0% within limits 0.0% highlighted
M/c bond angles:	98.5% within limits 1.5% highlighted		M/c bond angles:	99.3% within limits 0.7% highlighted
Planar groups:	100.0% within limits 0.0% highlighted		Planar groups:	100.0% within limits 0.0% highlighted

+ May be worth investigating further. * Worth investigating further.				

Figura 64.- Informe de procheck de mGLUR1 activa e inactiva. Antes de procesar mGLUR1 activa se ha recortado una parte (la hélice 8)

En general ambos informes nos dicen que algunos residuos tienen problemas estéricos, el siguiente paso es comprobar que residuos son y verificar si van a influir en los cálculos de docking. En realidad lo más adecuado sería intentar relajarlos con mecánica molecular (MM), pero algunos autores no recomiendan este paso si la estructura obtenida es congruente con los cálculos de

docking. Durante el calculo de MM se corre el riesgo de perder parte de la geometría que hemos modelado para diferenciar el receptor activo del inactivo(Martinelli and Tuccinardi, 2008)

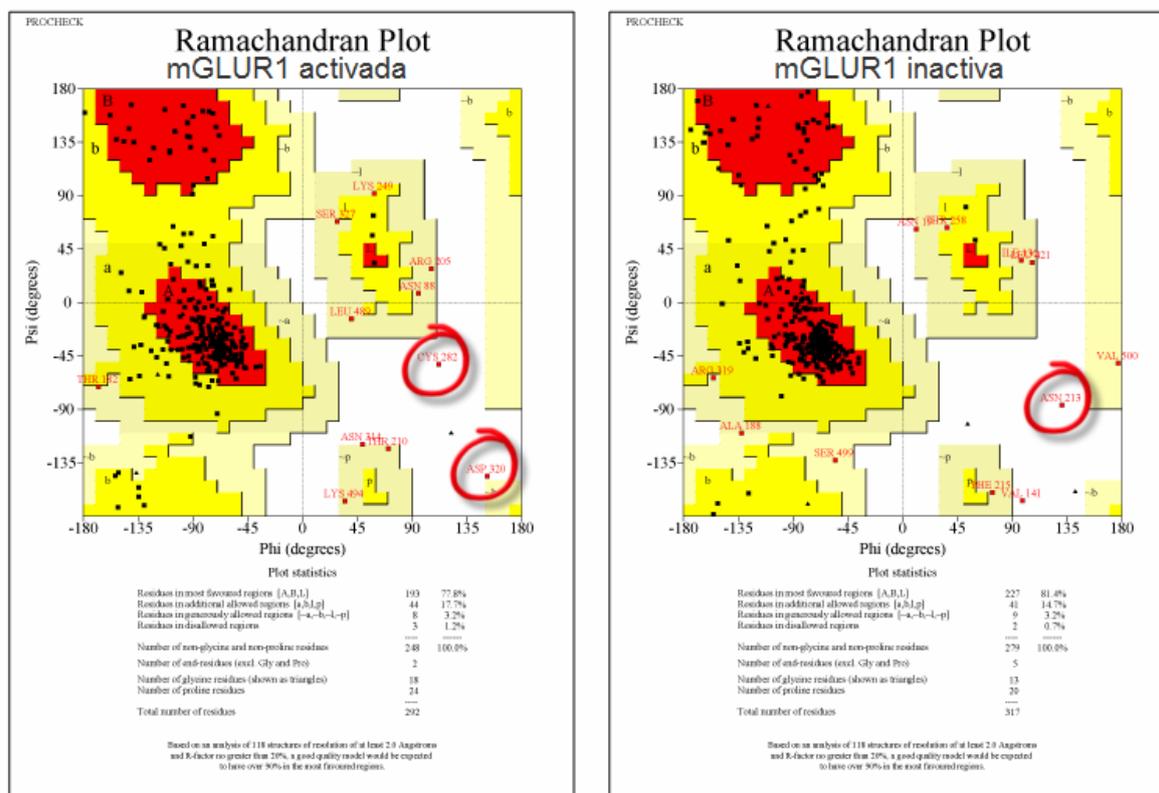


Figura 65.- Mapas de Ramachandran de las formas activa e inactiva de mGLUR1

En efecto, los residuos problemáticos, no se encuentran entre los señalados en el artículo como importantes, así que no procederemos a minimizar con MM.

5.3.6 El objetivo: Comprobar el sitio de unión con docking molecular

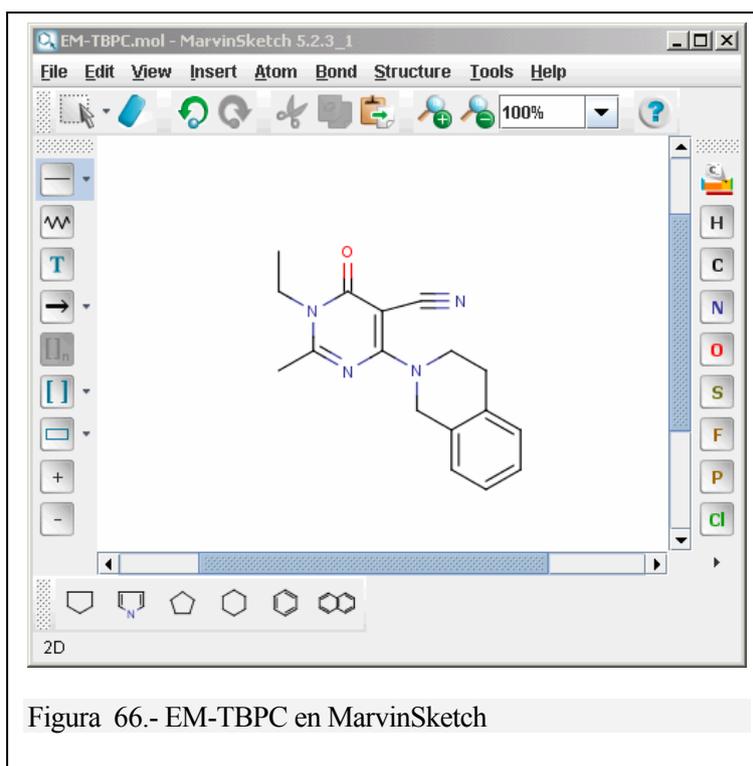
En el artículo de Malherbe se comprueba el sitio de unión con el ligando EM-TBPC. Nuestro objetivo es comprobar el sitio de unión con varios programas de docking y comparar el resultado. Emplearemos el mismo ligando y el software ArgusLab que ha sido contrastado con diferentes tipos de proteínas frente a AutoDock(Joy et al., 2006) [Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of GOLD, a commercial package and ArgusLab, a licensable freeware]. Posteriormente compararemos los resultados con otros programas.

5.3.7 Docking del ligando con ArgusLab.

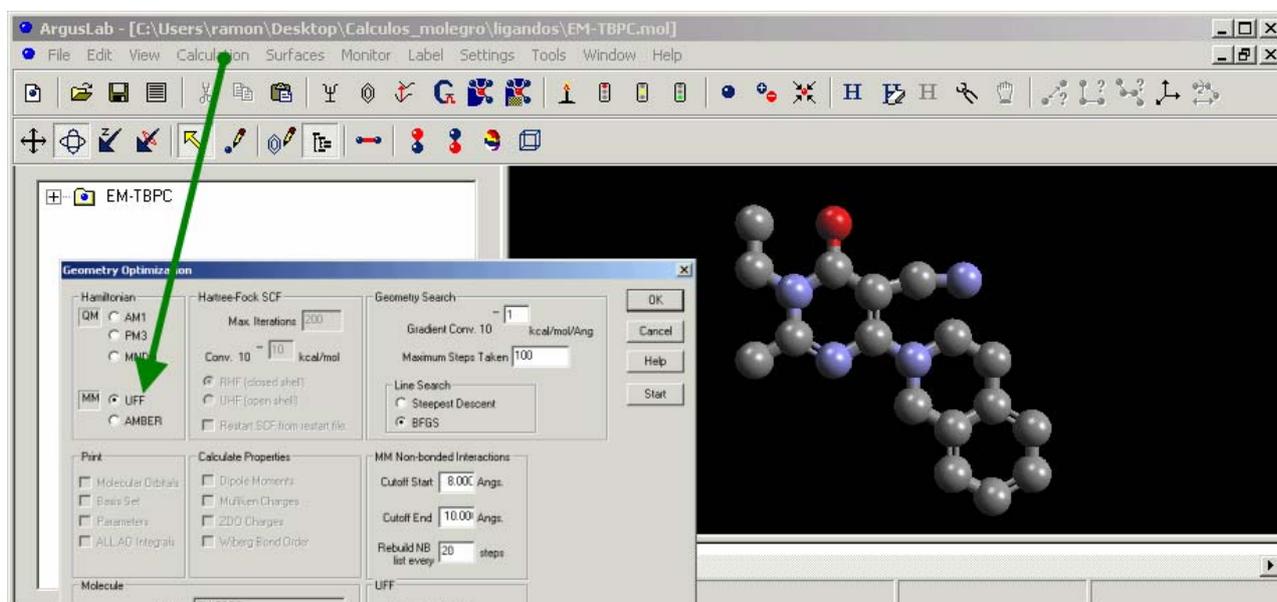
Para hacer docking sobre un receptor hay que seguir una serie de pasos que son estándar ((Joy et al., 2006)) en todos los programas de docking.

A. Preparación del ligando.

Preparamos una plantilla en 2D del ligando con MarvinSketch. Este fichero en 2D, se guarda en formato .mol, de momento no tiene geometría.



Una vez abierto el ligando con ArgusLab, le añadimos los hidrógenos que normalmente no están implícitos en los ficheros 2D. Seguidamente lo optimizamos su geometría con ArgusLab. Elegimos las opciones por defecto de UFF (semiempírico) (Figura 67). Este método es suficiente para optimizar la estructura del ligando para docking.



B. Preparar la proteína.

Abrimos el fichero pdb de la proteína activa, (mGLUR1_activa_calcs), y le añadimos los hidrógenos, seguidamente ocultamos los residuos y la pasamos a vista “cartoon – ribbon”, para que podamos ver mejor el hueco en donde tiene que “caber” el ligando. Hay que elegir una orientación y zoom que nos permita ver con claridad el hueco, ya que este primer paso lo tenemos que hacer a mano.

C. Colocar el ligando en el sitio de unión aproximado.

Copiamos el ligando sobre el fichero abierto de la proteína, y a mano lo llevamos aproximadamente hacia el sitio de unión (con mucha maña y cuidado).

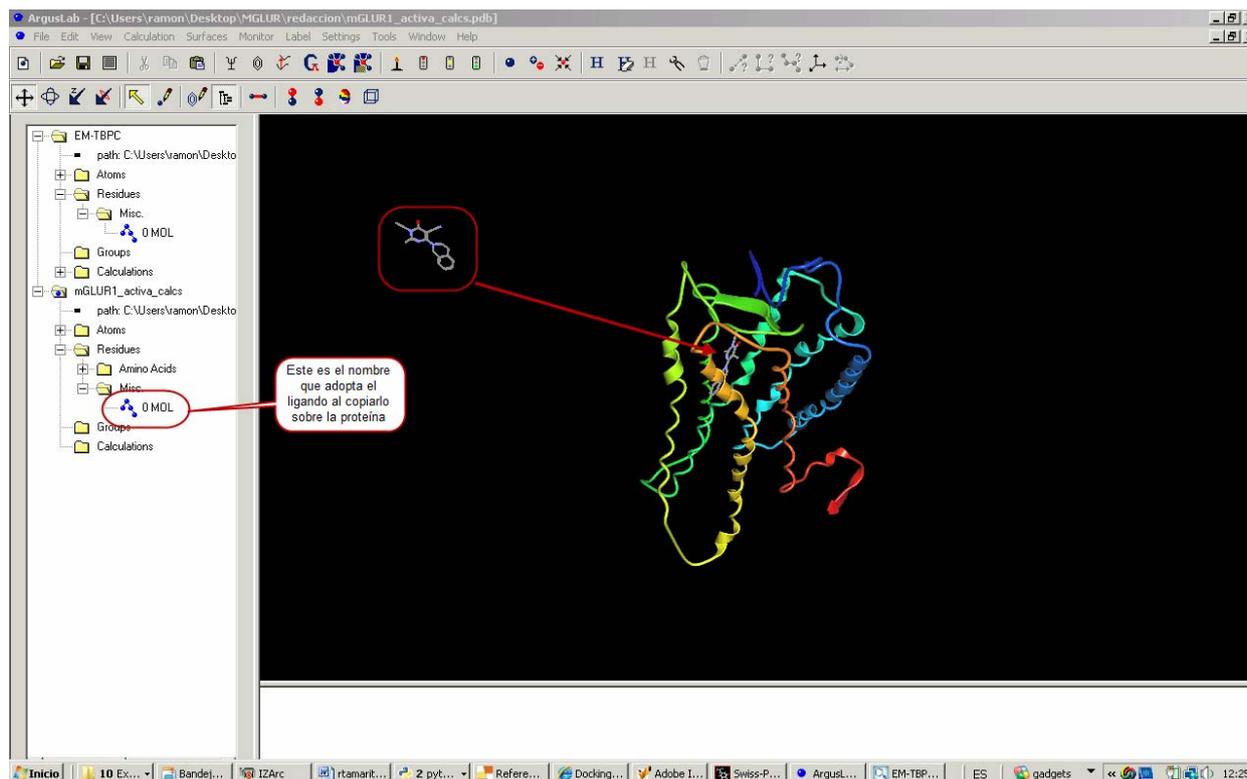


Figura 68.- ArgusLab colocación del ligando en el sitio de unión de forma aproximada.

4.- Preparar el sitio de unión aproximado.

Seleccionamos el ligando y escogemos la opción “make a ligand from this group”, y luego “con el ligando seleccionado, escogemos “make a binding grupo from this ligand”.

Creamos otro sitio de unión por proximidad seleccionado los residuos por proximidad (3.5 Å) y con la opción “make a binding site from selected residues”. Tendremos ahora la apariencia de la ventana inferior.

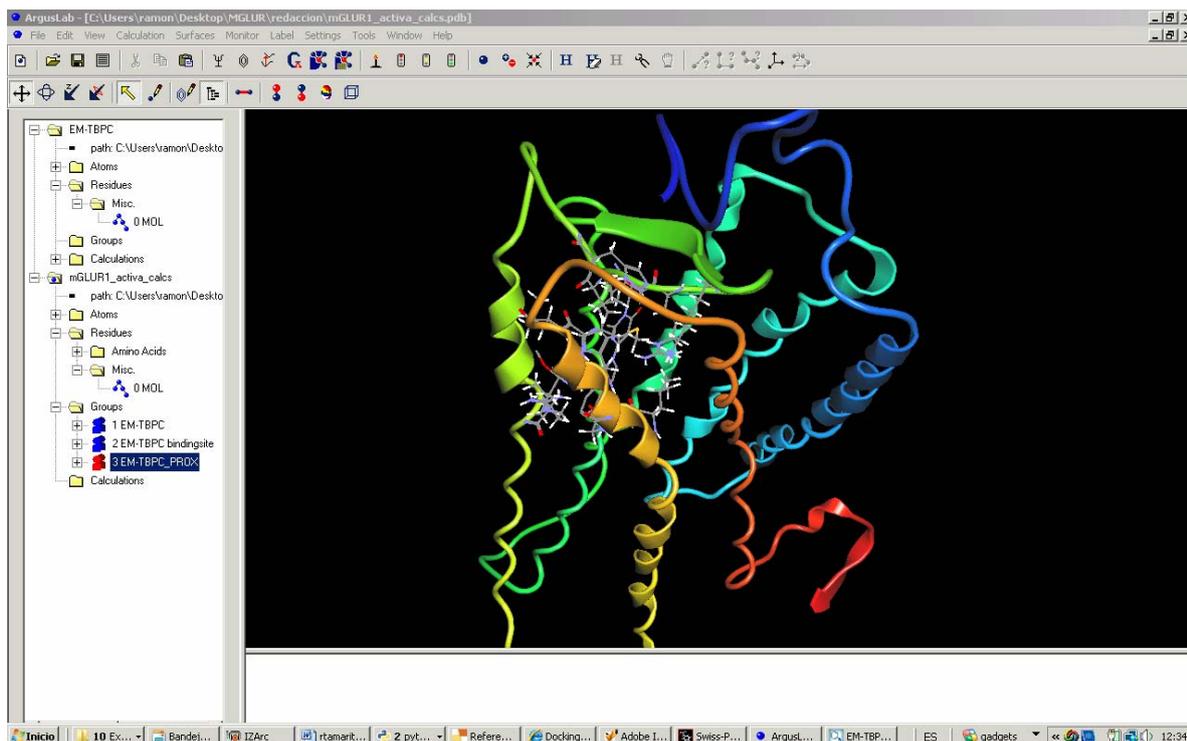


Figura 69. ArgusLab. Preparando el sitio de unión.

Seleccionamos del menú “Calculation”/“Dock a ligand”, y escogemos las opciones marcadas.

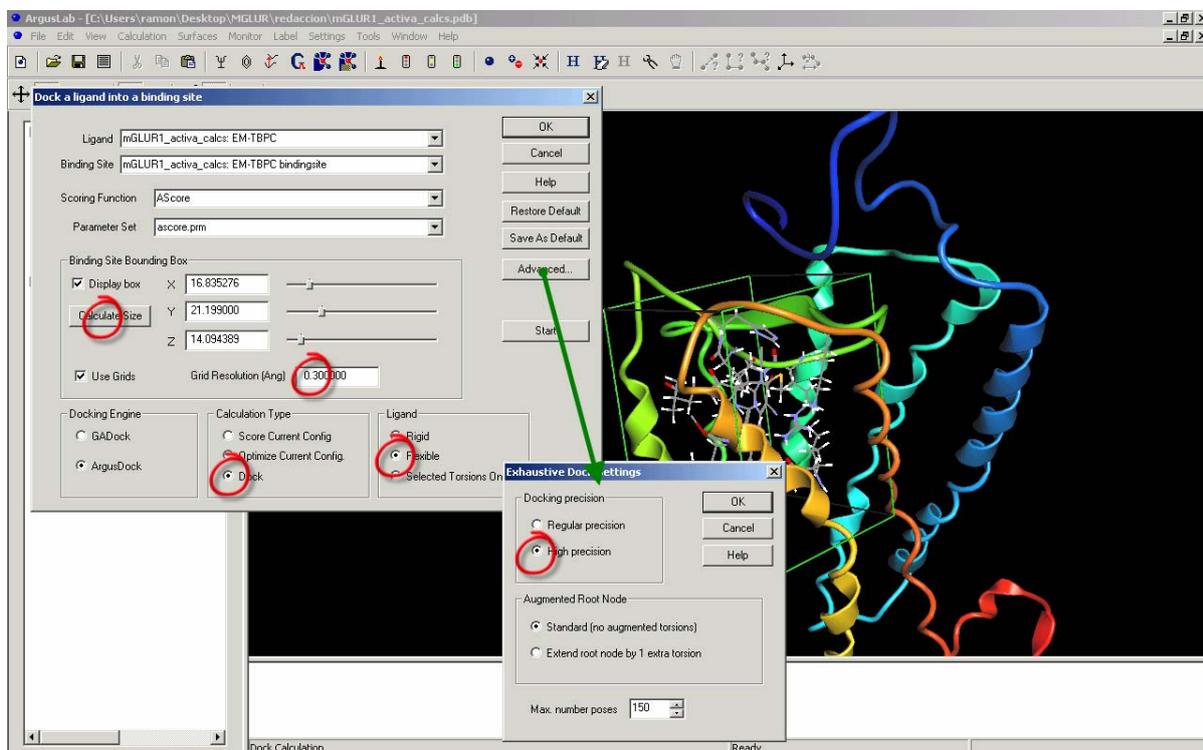


Figura 70.- ArgusLab. Preparando el docking.

D. hacer el Docking.

Ahora ya podemos seleccionar la opción “calculation” / “run” para correr el calculo.

El resultado es el siguiente:

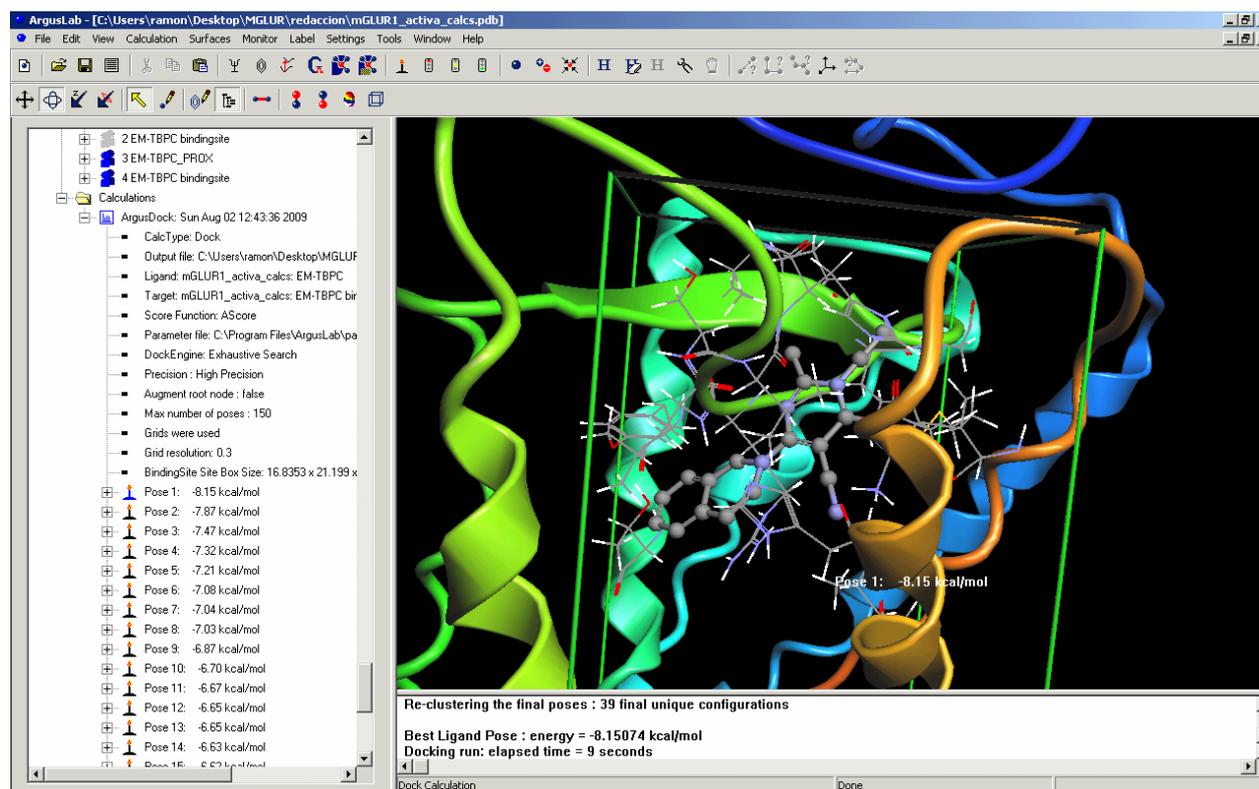


Figura 71.- ArgusLab. Imagen del resultado del cálculo.

La “pose” obtenida es muy similar a la obtenida en el artículo. Si repetimos el cálculo obtenemos energías similares (entorno a -8.15 Kcal/mol, en el artículo el valor experimental es de 10 micromoles) y las orientaciones son similares.

Si repetimos el proceso para la estructura mGLUR1 inactiva obtenemos valores de energía un poco inferiores (-8.4 Kcal/mol) que pueden no ser significativos ya que los márgenes de error en este tipo de cálculos son muy amplios. La diferencia entre ambas estructuras está en las “poses” que adopta el ligando aun estando en el mismo entorno.

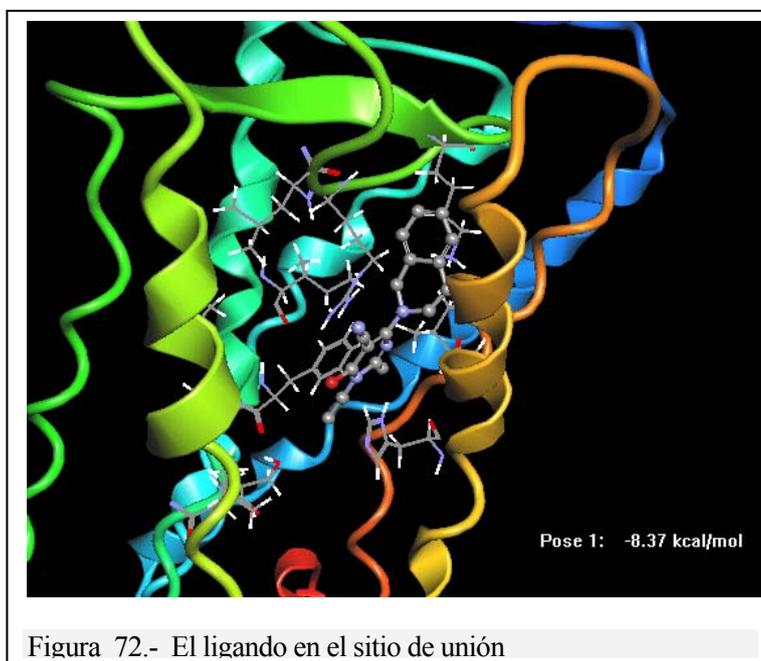


Figura 72.- El ligando en el sitio de unión

No obstante de ambas imágenes se observa que los residuos que interaccionan con el EM-TBPC son los mismos en ambos casos.

5.4 Docking del ligando con Molegro.

Molegro es un software comercial de docking similar a ArgusLab pero con prestaciones superiores, no obstante se pude pedir una licencia de prueba de un mes, tiempo suficiente para sacarle rendimiento en un proyecto como este . Repetimos el cálculo de docking con este software para comprobar si existen diferencia apreciable.

La rutina de calculo es similar y muy intuitiva (en este caso me remito a la ayuda del software): Preparación del ligando, preparación de la proteína y calculo. Una de las diferencia es que Molegro permite visualizar los posibles sitios de unión mediante el cálculo de cavidades dentro de la proteína y el informe de resultados diferencia la aportación de cada uno de los residuos a la energía final del complejo.

5.4.8 Detección de las cavidades y preparación del docking

Mediante la utilidad de detección de cavidades de Molegro observamos con claridad los posibles huecos que pueden ser sitios de unión para los ligandos. En concreto, el hueco mayor está situado justo donde habíamos predicho el sitio de unión con ArgusLab.

A partir de este hueco vamos a probar las orientaciones (lo hace solo el software) y la energía de cada sitio de unión. Únicamente modificamos el tamaño por defecto de la esfera dejándolo en 12 Å. El resto de opciones de docking las dejamos por defecto.

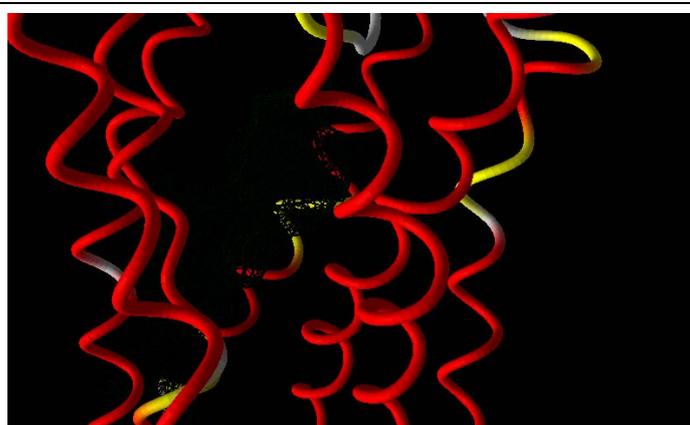


Figura 73.- Predicción de las cavidades en las proteínas. En la imagen el sitio predicho para mGLUR1 activa.

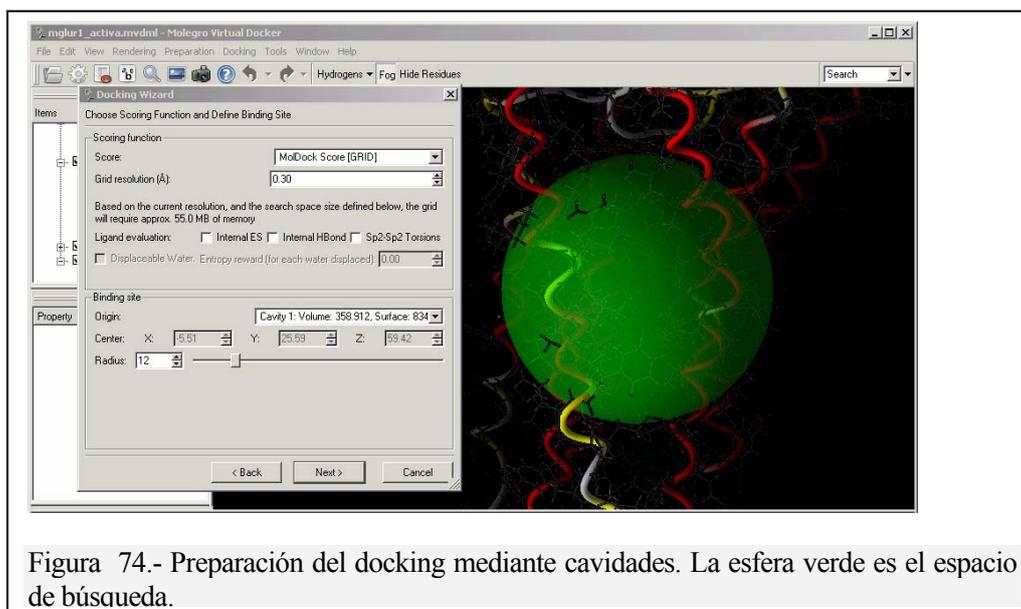


Figura 74.- Preparación del docking mediante cavidades. La esfera verde es el espacio de búsqueda.

El resultado se presenta en una ventana y se indica el fichero de salida para después cargarlo.

5.4.9 Poses de mGLUR1 activa

Las cinco poses que encuentra para mGLUR1 activa se agrupan en dos clusters cada uno con similares orientaciones y similar energía (Figura 76)

Molegro por defecto asigna dos tipos de ranking a las poses, uno basado en la puntuación propia "MolDockScore", otro en la energía calculada (en la tabla aparece la interacción con la proteína), y por ultimo asigna la posición mejor valorada con un mix de ambos "RerankScore" (Tabla 6).

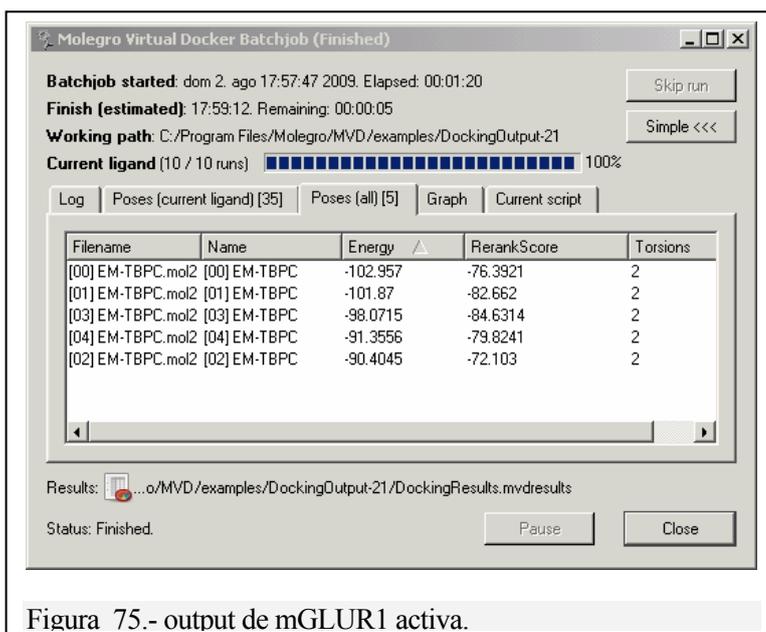


Figura 75.- output de mGLUR1 activa.

Name	Ligand	MolDockScore	Rerank Score	Protein	Cluster
[03] EM-TBPC	EM-TBPC	-980.715	-846.314	-107.989	1
[01] EM-TBPC	EM-TBPC	-101.87	-82.662	-111.312	1
[04] EM-TBPC	EM-TBPC	-913.556	-798.241	-100.871	2
[00] EM-TBPC	EM-TBPC	-102.957	-763.921	-118.086	3
[02] EM-TBPC	EM-TBPC	-904.045	-72.103	-103.996	3

Tabla 6.- Ranking de poses mGLU1 activa.

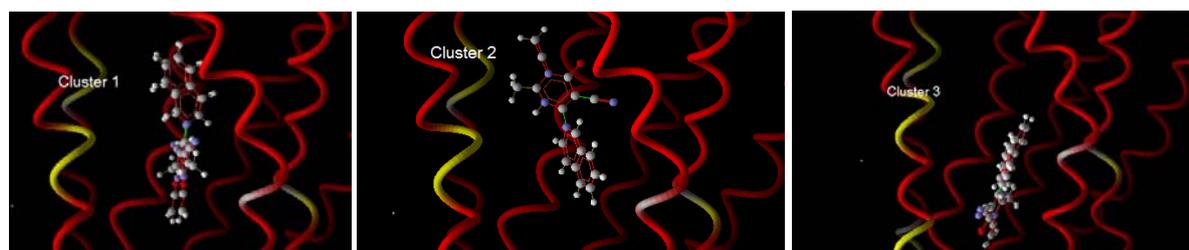


Figura 76.- Visualización de las poses de mGLUR1 activa.

El cluster más favorecido es el 1, los 10 aminoácidos que más interaccionan con el ligando son:

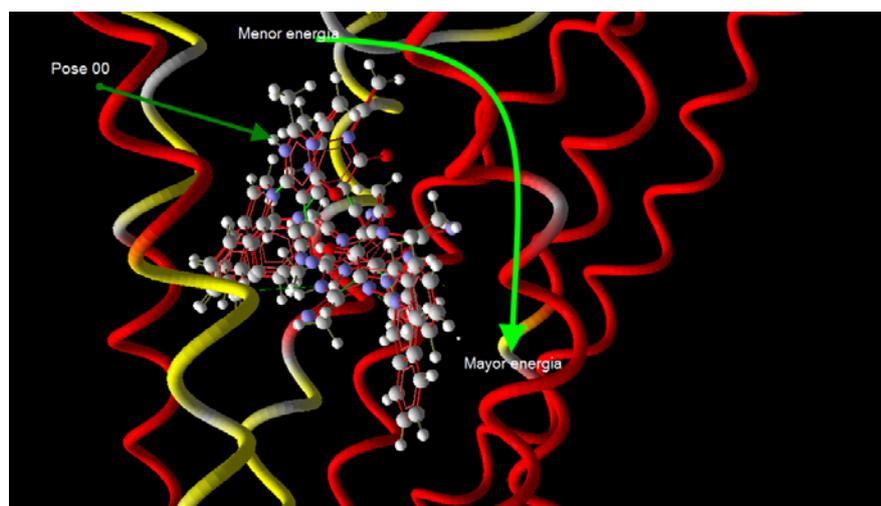
His388 -26.6805 ; Ala392 -15.0105 ; Leu391 -11.8822 ; Ile384 -8.93987 ; His413
 -7.57256 ; Pro385 -7.24695 ; Leu160 -6.41715 ; Arg319 -5.96912 ; Arg251
 -4.05831 ; Ala389 -3.24915.

5.4.10 Poses de mGLUR1 inactiva

En este caso no hay duda, el valor energía se correlaciona con el valor de RerankScore, la posición mas favorecida es la 00.

Ligand	MolDockScore	Rerank Score	HBond	Cluster (serie layout)
[00] EM-TBPC	-125.4	-997.368	-365.018	1
[02] EM-TBPC	-113.668	-952.585	-23.534	2
[01] EM-TBPC	-115.809	-951.313	0	3
[04] EM-TBPC	-107.778	-903.238	-204.633	4
[03] EM-TBPC	-106.38	-814.311	0	5

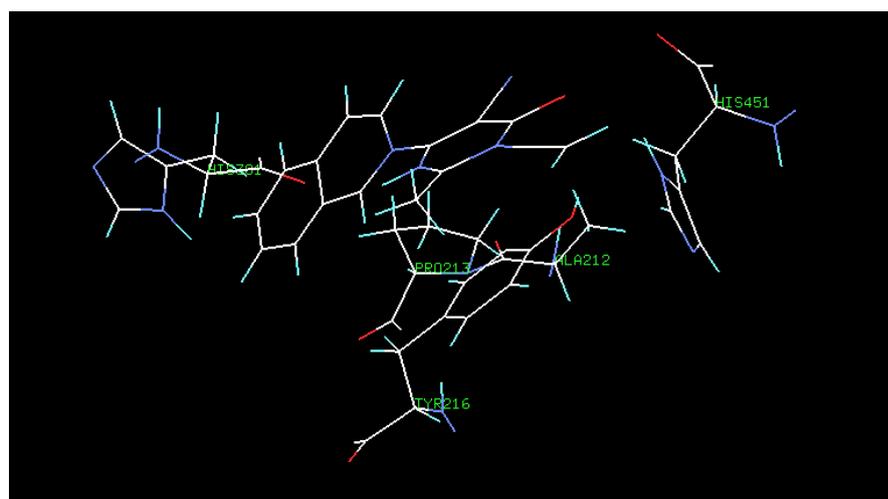
Tabla 7.- Ranking de poses de mGLUR1 inactiva. En este caso el cluster es un layout de energía. De mayor a menor según la posición.



Los 10 aminoácidos que más interaccionan con el ligando son:

Tyr216 -26.9413 ; His381 -22.9279 ; Pro213 -15.3738 ; His451 -12.6498 ; Ala212
 -9.78541 ; Arg382 -8.69849 ; Lys266 -8.38439 ; Cys269 -8.09722 ; Ile190
 -6.33211 ; Asp499 -5.3976

Desde SWissPdbViewer se puede obtener fácilmente y una vista de la interacción de EM-TBPC con los residuos:



Una cuestión a tener en cuenta es que Molegro no da valores calibrados de energía, aunque es mucho más eficiente que ArgusLab y sobre todo es más fácil de manejar.(pero no es freeware).

5.4.11 Discusión

A simple vista se puede comprobar que los residuos que interaccionan con el ligando no son los mismos que los verificados experimentalmente y corroborados en el artículo mediante simulación. La numeración de los aminoácidos, va implícita en los pdb's y no he podido hacerlos coincidir con la numeración real, pero a pesar de esto, tampoco coinciden con los del alineamiento original. Sin embargo, hay que llegar hasta aquí para darse cuenta que a pesar del desfase en la numeración, los valores no coinciden con los experimentales.

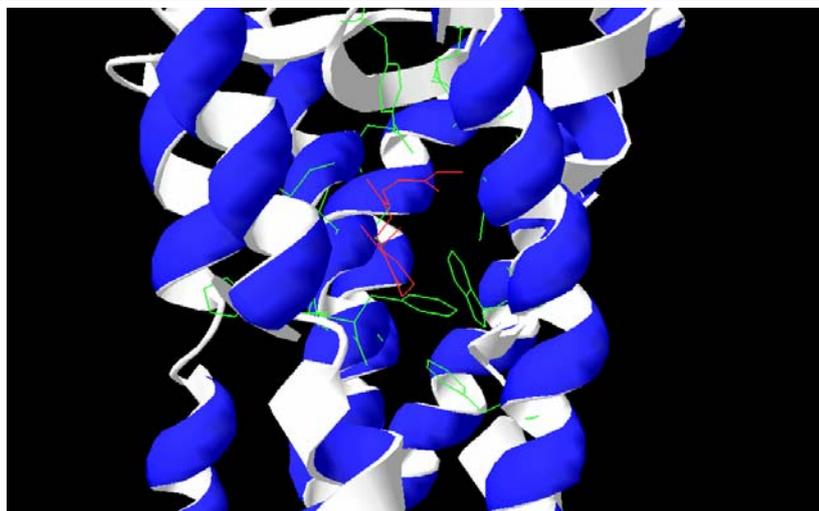


Figura 77.- Imagen de la rodopsina interaccionando con el retinal (pdb 2i35). En rojo el retinal, en verde los aminoácidos que interaccionan con el.

La localización del sitio de unión del ligando es correcta ya que se sitúa exactamente tal y como esta el retinal en la rodopsina, tal y como se puede apreciar en la Figura 77.

Si rescatamos los alineamientos originales y los comparamos con las secuencias extraídas de los pdb's de las proteínas que hemos modelado comprobamos que ¡¡¡no son iguales!!!, en algún momento del proceso de cálculo (creo que al pasar los alineamientos a HOMMER), parte de la secuencia a cambiado. **Sin querer, he construido un nuevo modelo de GPCR, que tiene el mismo comportamiento computacional que los GPCRs naturales.**

Para tener mayor seguridad en el valor de la energía de interacción del EM-TBPC en ambos estados he repetido el experimento de docking en un servidor (<http://www.dockingserver.com/>) que permite hacer algunos cálculos gratuitos con AutoDock. Los parámetros de docking por defecto los he modificado para que coincidan con los empleados anteriormente. Los valores de energía de AutoDock, están perfectamente calibrados y se suelen usar como valores de referencia para ajustar a valores experimentales. En este caso los resultados de interacción para las formas activa e inactiva es similar al obtenido en ArgusLab y Molegro, véase por ejemplo el output de la Figura 78

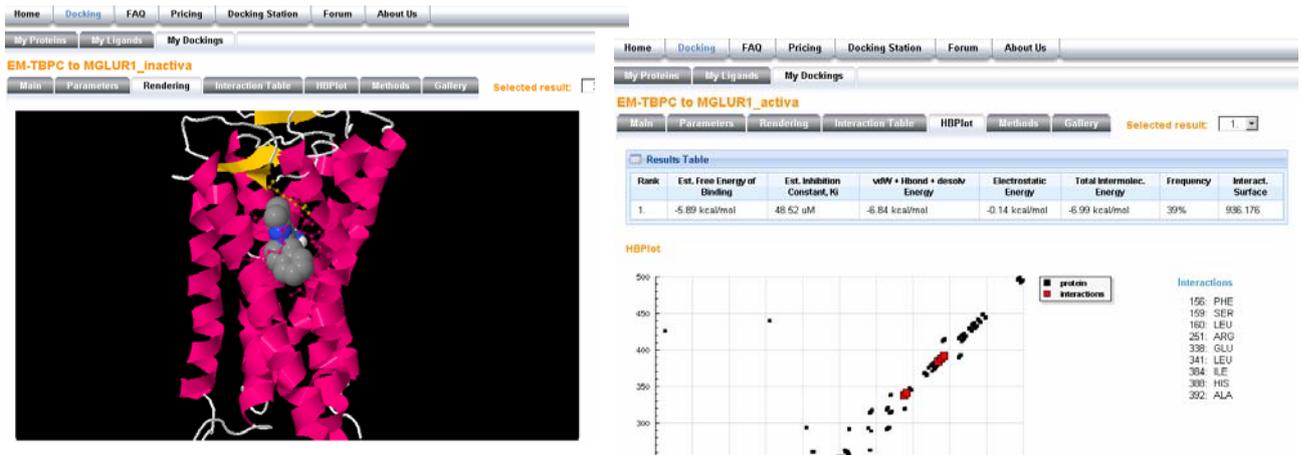


Figura 78.- Output de Docking Server

El valor de la constante de equilibrio para la forma activa resulta ser de 48.52 μ M (-5.89 kcal/mol) frente a los 2.15 μ M (-7.73 kcal/mol) de la forma inactiva. **Esto quiere decir que, este ligando parece que estabiliza la forma inactiva del receptor.**

En las bases de datos consultadas, no hay depositados modelos teóricos de mGLUR1, y los datos existentes hasta el momento sobre el potencial de modulación alosterico de este receptor son escasos. De hecho, hemos podido comprobar que generar un modelo “funcional” de este receptor no es una tarea sencilla.

En el caso del artículo de Malherbe, la correcta identificación del sitio de unión facilita la tarea de “guiar” el proceso de SDM para el desarrollo de fármacos capaces de modelar la actividad del receptor mGLUR1, permitiendo mGLUR1 rectificar indirectamente el paso de iones a través del canal de potasio.

5.5 Introducción a los reguladores alostericos.

Dos años después del artículo de Malherbe se publica el primer review sobre la modulación alostérica en la familia C de GPCRs. El artículo de Noeske (Tobias et al., 2006) es la primera revisión de los moduladores alostericos de la familia C. Uno de los temas que se discuten en el artículo, es precisamente si ¿Es efectiva la estructura de la rodopsina como plantilla para modelar los GPCRs de la familia C, si no existe casi identidad en la secuencia (menos del 20%). **El resultado es que las investigaciones con modelos realizados a partir del esqueleto de la rodopsina es suficiente para explicar no solo el mecanismo molecular del los GPCRs de las familias A y B, sino también de la C.** Noeske revisa y resume los pocos datos existentes hasta el momento, citando en distintas ocasiones el artículo de Malherbe. Hay que señalar que en el año de publicación del artículo aún no estaban disponibles las estructuras experimentales de la Rodopsina en los dos estados.

Los mGLUR se caracterizan por ser activados en el dominio proteico extracelular. Igualmente, este tipo de reguladores tienen cierta actividad basal. Es decir el receptor no tiene dos estados absolutos ON/OFF, sino que actúa

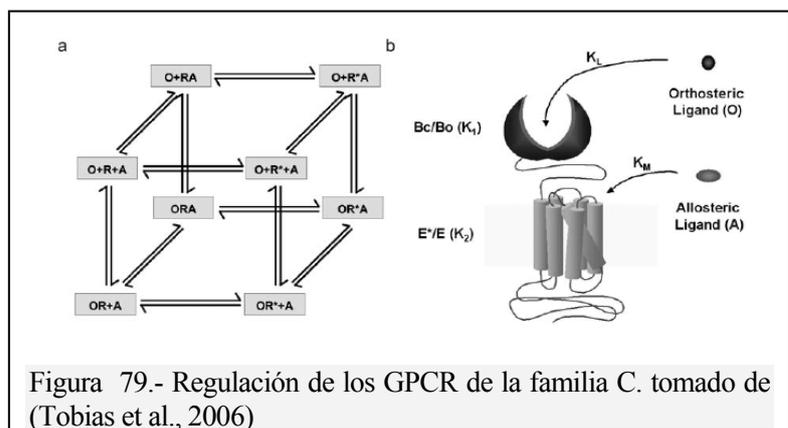


Figura 79.- Regulación de los GPCR de la familia C. tomado de (Tobias et al., 2006)

más bien como un reóstato regulando de forma fina la apertura o cierre de canales de potasio. Los dos estados (Activo/Inactivo) del receptor están en un equilibrio dinámico, y ambos coexisten aunque no existan ligandos anclados en el sitio de unión situado en el dominio transmembrana (Figura 80). En estos casos, no hablamos de fármacos o ligandos agonistas o antagonistas, sino que aparecen el concepto de ligando “alostérico”.

En este caso, es como si el receptor tuviera dos reguladores (uno el natural) y otro el fármaco y no actúan de forma competitiva, sino que cada uno tiene su propio sitio de unión, este equilibrio se representa mediante la Figura 79.

El estado de equilibrio se puede simbolizar mediante un gráfico de energía (ver Figura 79). La línea verde representa el perfil de energía en el estado normal, sin que tengamos la acción de un ligando (o fármaco) anclado en la zona transmembrana, y la línea punteada cuando está actuando el ligando o fármaco. Se observa que puede actuar de dos formas:

- A) Estabilizando el estado inactivo (reguladores negativos o antagonistas), o
- B) Estabilizando el estado activo (reguladores positivos o agonistas).

A su vez dentro de los antagonistas, podemos encontrarnos con agonistas inversos, es decir supra-activan al receptor más que estabilizar el estado inactivo. Algunos de los ejemplos son el CPCOOEt y el BAY36-7620, que parece ser que actúa de esta forma sobre los mGLUR.

La forma de actuar de los ligandos alostericos puede ser investigada mediante docking y modelado molecular gracias al conocimiento actual de las estructuras de la rodopsina activa e inactiva. La estructura activa puede servir como modelo para el estado activo del receptor (sin ligando actuando sobre el) y la forma inactiva modela el estado libre. Para comprobar computacionalmente si un ligando es un regulador positivo o negativo, hay que calcular la Energía (ΔG , en realidad la diferencia de energía libre) del complejo ligando/proteína con ambos modelos y comparar los valores:

- A. Si la ΔG es más negativa en el estado inactivo tendremos un ligando regulador negativo
- B. Si la ΔG es más negativa en el estado activo tendremos un regulador positivo.

Como asevera Noeske, la principal problemática en el cálculo de estos valores es si la estructura tomada como plantilla es válida. Las diferencias de energía y de estructura entre ambas son mínimas y por tanto el modelado debe ser muy fino para poder realizar estos cálculos. Como hemos visto en el ejemplo anterior, en ocasiones tan solo están separadas por una o dos kcal/mol, o incluso menos como es el caso de los agonistas inversos.

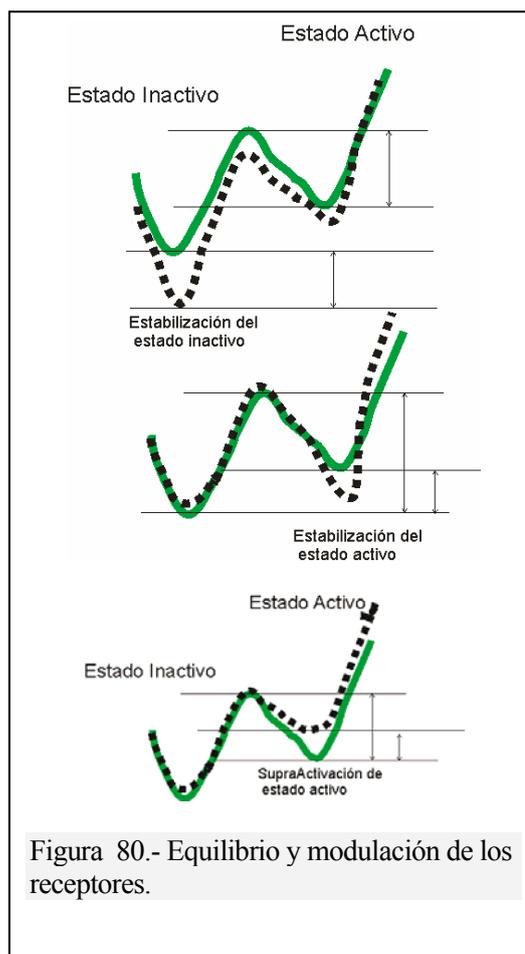


Figura 80.- Equilibrio y modulación de los receptores.

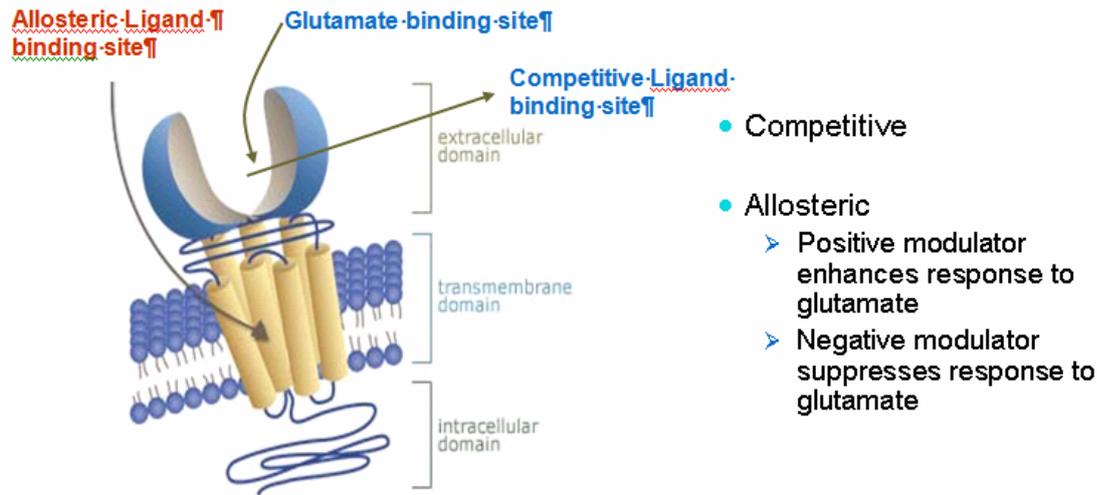


Figura 81.- Tipos de ligandos alostericos. Fuente: Presentación de Noeske.

5.6 Descripción del artículo de Yanamala. "Preferential binding of allosteric modulators to active and inactive conformational states of metabotropic glutamate receptors."

Dos años después del artículo de Noeske, Yanamala va un poco más lejos, intentando verificar si las estructuras disponibles de Rodopsina activa e inactiva son validas para modelar los estados activo e inactivo de una familia tan lejana como los mGLUR.. Y más aún, compara los datos de dos programas de docking a efectos de testear la fiabilidad de los mismos en el estudio de los fármacos alostericos.

Yanamala, modela el estado inactivo usando 1f88 como plantilla, y el activo usando estructuras de rodopsina modeladas por ANM (Isin et al., 2006). En este método se parte de modelos inactivos de rodopsina y ajustan los valores estructurales mediante técnicas de fluorescencia. Los programas que testean son Autodock (v3.0) y ArgusLab (v3.0).

La hipótesis que pretenden demostrar Yamanala y Col. es que el modelo por ANM es adecuado para explicar las diferencias energéticas debidas a la modulación alostérica en mGLURs, y contrastar las diferencias entre los modelos de fuerzas de ambos programas de docking.

Para ello generan pares de modelos de todas las mGLURs en las que habían datos experimentales, algunas de rata y otras de humano (los datos de reguladores de mGLURs no eran entonces abundantes) y hacen docking sobre ellos con ambos programas. Los ligandos que utilizan

El sitio de unión lo confirman mediante comparación con los estudios previos (por ejemplo el artículo de Malherbe) y con los disponibles en esos momentos de SDM.

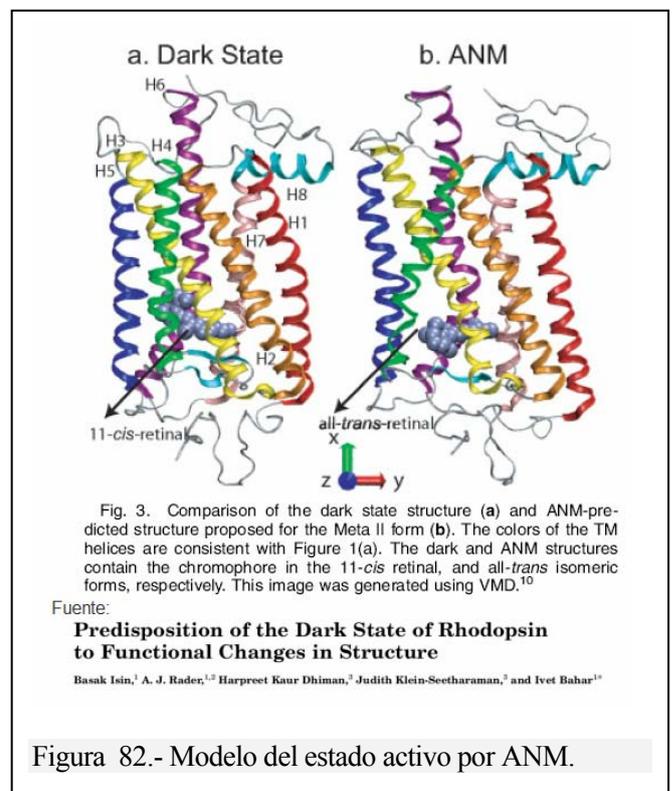


Figura 82.- Modelo del estado activo por ANM.

El resultado de la comparación es que: En el 57%, y el 67% de los casos de reguladores negativos y positivos respectivamente, es predicho correctamente por ambos programas. ArgusLab predice el 86 y 89% en negativos y positivos respectivamente y AutoDock el 71 y 78%. Los valores de energía que obtienen no los comparan cuantitativamente con los valores experimentales. La tabla de resultados que presentan indica en algunos casos la desviación estándar de las repeticiones de docking.

Normalmente dos experimentos de docking nunca dan el mismo valor de energía ni de posición, hay pequeñas desviaciones de uno a otro experimento. Actualmente los programas de docking comerciales (y actualmente autodock) tienen opciones de minimización y optimización automáticas de las poses con menores valores energéticos. En el caso de ArgusLab la pose hay que optimizarla a mano, como una opción después del docking inicial. El proceso de optimización es más lento que el de búsqueda inicial (del orden de cuatro veces en ArgusLab), por eso se realiza posteriormente si hay muchos ligando que comprobar

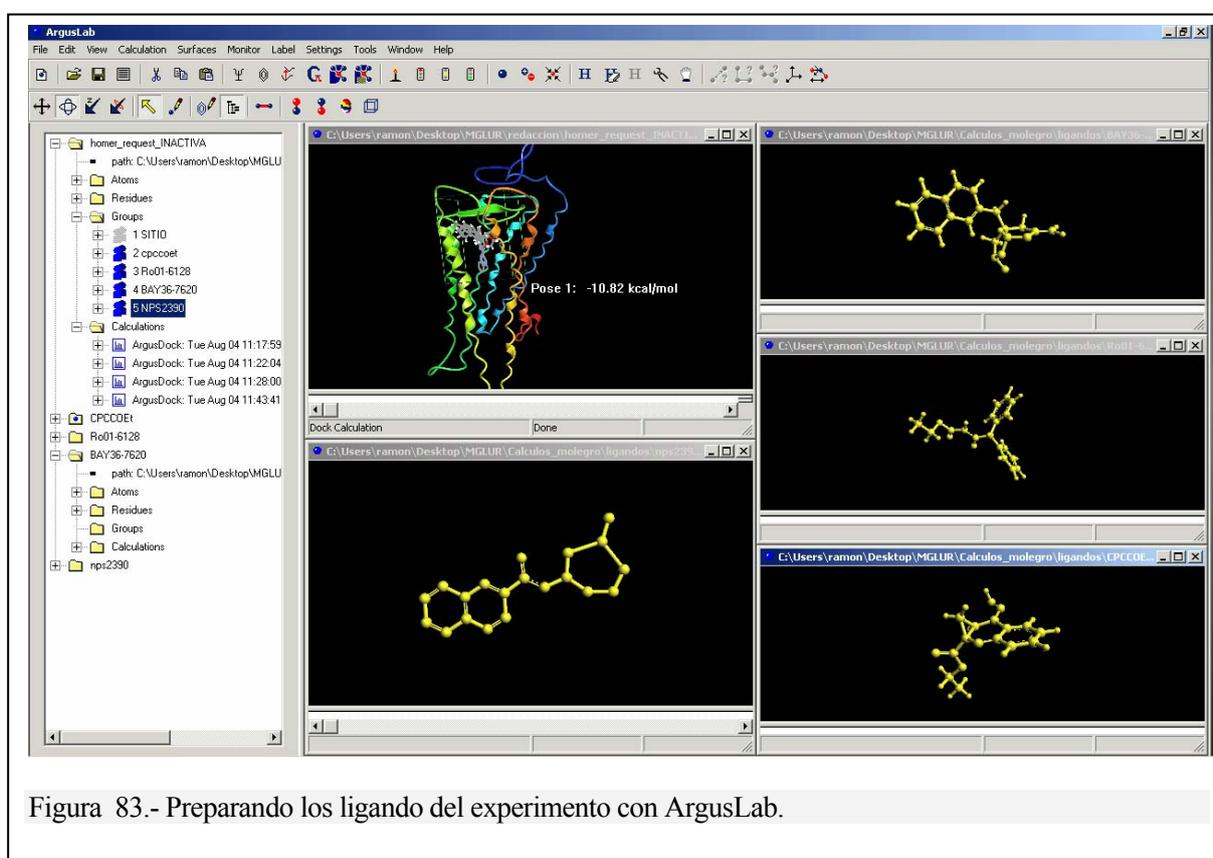


Figura 83.- Preparando los ligando del experimento con ArgusLab.

5.6.12 Replanteando el problema.

El objetivo inicial de este epígrafe era intentar reproducir los resultados del artículo de Yamanala con las dos estructuras de mGLUR1 humana obtenidas en el apartado anterior y comparar los resultados. Es evidente que con la mutación accidental que hemos sufrido los datos no van a coincidir. No obstante como están calculados, no esta de más analizarlos y comprobar si los resultados tienen fundamento.

5.6.13 Resultados

Empleando la metodología de cálculo descrita en apartados anteriores se han calculado y tabulado los valores de energía de las poses más favorecidas con mGLUR1_Activa_mutada y mGLUR1_inactiva_mutada. Los valores resultantes están en la tabla Tabla 8.

	AUTODOCK		ARGUSLAB	
	Activa	Inactiva	Activa	Inactiva
Ro67-7476 (Ag. positivo)	NO C. (-8.56)	NO C. (-6.88)	-8.37 (-10.02)	-11.26 (-9.18)
Ro01-6128 (Ag. positivo)	-6.00 (-11.06)	-7.47 (-7.06)	-10.64 (-12.54)	-11.39 (ND)
CPCCOEt (Ag. negativo)	-4.78 (-6.8)	-6.80 (-7.46)	-8.04 (-8.6)	-9.50 (-9.37)
BAY36-7620 (Ag. negativo)	-7.58 (---)	-9.13 (---)	-10.91 (---)	-12.31 (---)
NPS-2390 (Ag. negativo)	NO C. (-8.72)	NO C. (-8.41)	-9.89 (-9.43)	-10.81 (-10.46)
EM-TBPC (Ag. negativo)	-5.89 (-6.68)	-7.73 (-6.82)	-8.15 (-9.43)	-8.37 (-10.46)

Tabla 8.- Valores de energía de los cálculos de docking (todos los valores en kcal/mol). Los valores entre paréntesis son los valores equivalentes del artículo de Yamanala. Los valores "NO C." no fueron calculados por restricciones de licencia del servidor de autodock (<http://www.dockingserver.com>). Los valores "----" no figuran en el artículo original. Los valores señalados en verde son los más favorecidos de su correspondiente pareja.

Los residuos que interactúan con el receptor se pueden encontrar en la tabla Tabla 9, en todos los casos se sigue un patrón similar pero diferenciado en la forma activa y en la inactiva.

AMINOACIDOS INTERACCIONANTES - mGLUR1 mutada		
	Activa	Inactiva
Ro01-6128	157ALA 159SER 160LEU 206CYS 251ARG 314SER 318HIS 319ARG 384ILE 388HIS 391LEU 392ALA	222LYS 226ARG 275VAL 313TYR 321ALA 323PRO 383PRO 384GLN 387SER 388LEU 461PHE 482LEU 483GLU 486GLU
CPCCOEt	156PHE 159SER 160LEU 251ARG 384ILE 385PRO 388HIS 392ALA	222LYS 226ARG 279GLU 321ALA 361PHE 383PRO 384GLN 388LEU 461PHE 482LEU 483GLU 486GLU
BAY36-7620	156PHE 157ALA 159SER 160LEU 319ARG 384ILE 388HIS 391LEU 392ALA 413HIS	226ARG 279GLU 284GLN 321ALA 323PRO 361PHE 383PRO 384GLN 387SER 388LEU 461PHE 482LEU 486GLU
EM-TBPC	156PHE 159SER 160LEU 251ARG 338GLU 341LEU 384ILE 388HIS 392ALA	212ALA 216TYR 314ARG 382ARG 451HIS 454LEU 455ALA 476HIS 499ASP

Tabla 9.- Residuos interaccionantes mGLUR1_mutada con diversos ligandos.

5.6.14 Discusión y conclusiones

Los valores de energía obtenidos están dentro de los márgenes de los valores obtenidos por Yamanala. En algunos casos incluso tienen un parecido asombroso. Por ejemplo, los valores de energía calculados por Arguslab de CPCCOEt son idénticos, y la diferencia de energía entre ambos estados es similar en ambos programas (entre 1.5 y 2.0). En el caso de NPS-2390 ocurre lo mismo. También están correlacionadas de esta forma las diferencias de energía entre los estados de BAY

36-7620. Este hecho indica que no solo la proteína interviene en la selectividad, sino también las características conformacionales del ligando.

Hay ligando que tienen comportamiento energético similar en diferentes proteínas, tenemos por ejemplo el caso de los nombrados anteriormente. La posibilidad de conocer el comportamiento de un sistema a priori, parece muy interesante, las posibles interacciones de un solo fármaco con diferentes receptores parece posible.

En la versión mutada de mGLUR1, con los ligandos relacionados siempre es el modelo inactivo el que tiene los valores de energía más favorables. Esto indica que la mutación de los aminoácidos del hueco de la rodopsina ha ocasionado que todos se comporten como reguladores negativos (tienden a estabilizar la energía del estado inactivo). Los resultados de los cálculos indican, como sugiere el artículo de Noeske es el esqueleto de Rodopsina, y no solo la composición de aminoácidos del mismo, sino la forma tridimensional que adopta. No obstante no queda demostrado que la formación de complejo pueda reducir también la altura del pico que separa ambos estados.

Tanto las herramientas como las bases de datos bioinformáticas actuales dan soporte a este tipo de requerimientos en forma de alineamientos de cientos de secuencias y patrones indetectables a simple vista. Los patrones en muchos casos como este, son muy simples, y tan solo uno o dos aminoácidos de una cadena de 50 esta alineado (ver - Figura izquierda Alineamiento empleado en el artículo de Malherbe. Figura derecha: Utilidad de predicción de la estructura secundaria de JalView.).

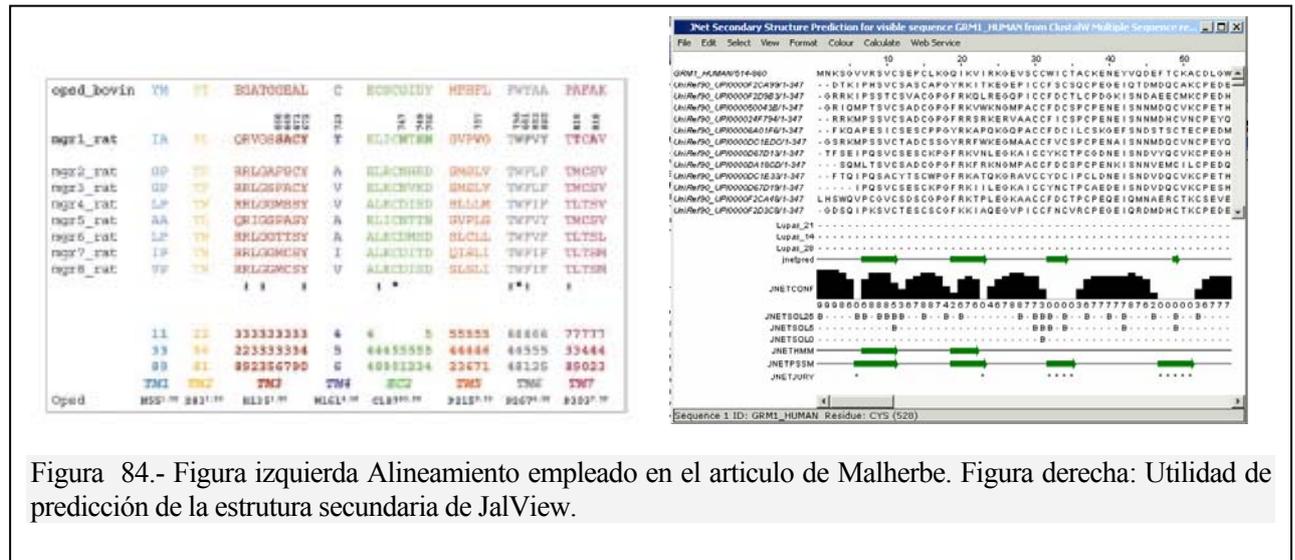


Figura 84.- Figura izquierda Alineamiento empleado en el artículo de Malherbe. Figura derecha: Utilidad de predicción de la estructura secundaria de JalView.

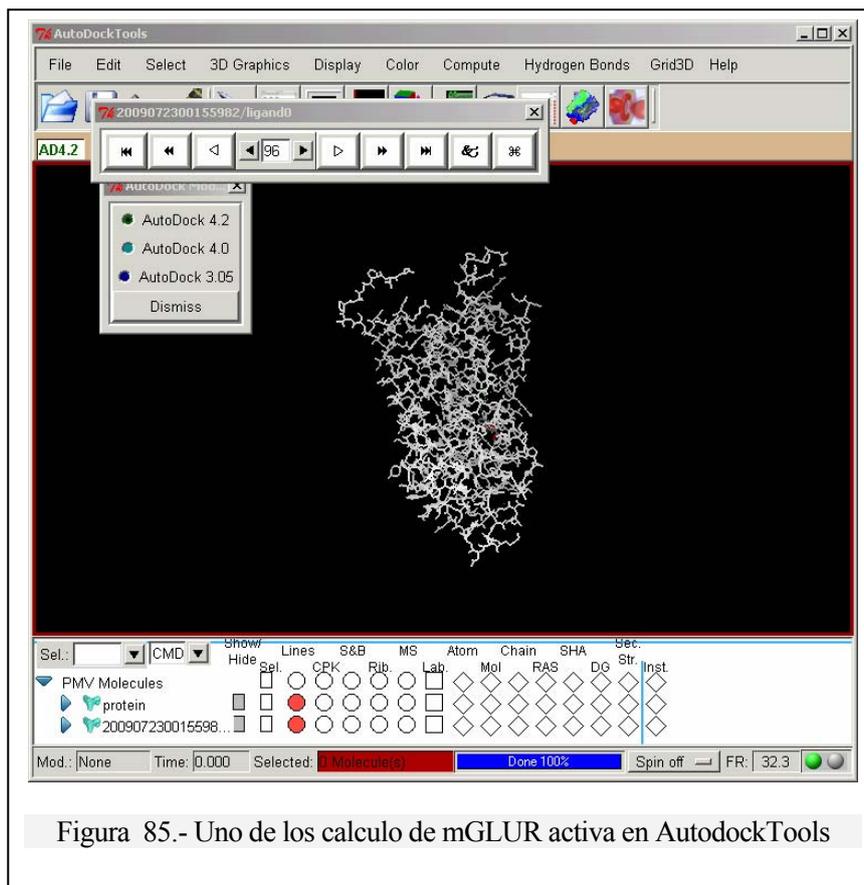


Figura 85.- Uno de los calculo de mGLUR activa en AutodockTools

El método empleado por Yamanala para modelar la estructura activa parece bastante fiable y los resultados están de acuerdo con los experimentos. El software ArgusLab me ha sorprendido por su potencia, aunque aun tiene algunos “bugs”, este programa parece que no ha sido actualizado desde entonces.

Respecto a Autodock, es un buen programa, aunque es inejecutable en un ordenador convencional, se necesita un servidor dedicado y mucha paciencia (que no tenemos) para sacar resultados. Las primeras pruebas de este caso las realice en mi ordenador de sobremesa y tardaban mas de 12 horas, algunos de los cálculos en el servidor de autodock han llegado a tardar 4 horas. Su interface grafica (AutoDock Tools), es muy interesante. Ofrece multitud de opciones y está perfectamente integrada con Pymol como visualizador.

Por ultimo, añadir que en pocos años veremos simulaciones de fármacos sobre sistemas complejos (como este caso) totalmente resueltas computacionalmente.

6 Modelado molecular de los receptores de adenosina.

6.1 Introducción y artículos de base.

6.1.1 Enfoque de caso práctico.

Los receptores de la adenosina (ARs) (http://en.wikipedia.org/wiki/Adenosine_receptor) son neuro-moduladores que tienen a la adenosina como ligando endógeno, y son miembros de la superfamilia de GPCRs, perteneciendo a la clase A (“Rodopsin like”). En humanos hay cuatro clases de ARs (clasificados en 3 en GPCRDB, <http://www.gpcr.org/7tm/classes/adenosine/>):

- A₁ (A1AR) (<http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorDisplayForward?receptorID=2166>): Está involucrado principalmente en la regulación del consumo de oxígeno a nivel coronario
- A_{2A} (A2AR) (<http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorDisplayForward?receptorID=2168>): Principalmente regula los procesos anti-inflamatorios por todo el organismo.
- A_{2B} (A2AR) (<http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorDisplayForward?receptorID=2170>): Es un componente principal de los axones e interviene en los procesos de neurotransmisión.
- A₃ (A3AR) (<http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorDisplayForward?receptorID=2172>): Está relacionado con procesos de inhibición de melanomas y procesos inflamatorios.

El descubrimiento de esta serie de neurotransmisores abrió el camino para el desarrollo de una gran variedad de fármacos capaces de tratar diferentes enfermedades como el asma, desordenes neuro-degenerativos, inflamaciones crónicas como la artritis reumatoide, y muchas otras relacionadas con las rutas metabólicas de la adenosina. La investigación bioinformática en los ARs, como en el resto de GPCRs está limitada, por no disponer de modelos estructurales detallados. La gran mayoría de los modelos se han desarrollado mediante modelado por homología basándose en la estructura inactiva de la rodopsina bovina.

En esta aplicación práctica, nos centraremos en el A3AR, ya que:

1. El modelo bioquímico de activación es el mismo en cada caso: responden a cambios de la concentración de adenosina
2. Desde el punto de vista de la conservación de su secuencia son muy parecidos (véase Figura 86), tienen muchos ligandos comunes. No obstante, según el tipo existen en algunos casos ligandos específicos para cada uno de ellos.
3. Actualmente se están desarrollando fármacos muy interesantes, mediante modelado molecular (solo en los últimos años) (Hasko et al., 2008)
4. Como indica el artículo de Gessi (Gessi et al., 2008) “tiene un rol enigmático” en la biología molecular, ya que ofrece facetas contrapuestas como regulador de procesos inflamatorios y cancerígenos.

Me basaré en cinco artículos de base de los cuales extraeré algunos ejemplos de aplicación de las técnicas de modelado orientado en la estructura y su extensión a experimentos de screening. Los artículos de base son los siguientes:

1. (Gessi et al., 2008), "The A3 adenosine receptor: An enigmatic player in cell biology". Es un artículo reciente de review, en donde se revisan todos los procesos contrapuestos del A3AR, y los avances farmacológicos. No es un artículo de bioinformática, pero es necesario para entender el papel fundamental del A3AR en el organismo.
2. (Martinelli and Tuccinardi, 2008), "Molecular modeling of adenosine receptors: new results and trends", que nos servirá junto con los datos existentes en la base de datos GPCRDB para tener una visión general del modelado de los ARs. Gran parte de los compuestos y métodos que usaremos a lo largo de este capítulo están allí relacionados.
3. (Ivanov et al., 2007). "Computer aided comparative analysis of the binding modes of the adenosine receptor agonists for all known subtypes of adenosine receptors". Es el primer ejemplo práctico, describe los sitios de unión de los agonistas de A3AR.
4. (Wei et al., 2009) "Molecular docking study of A3 adenosine receptor antagonists and pharmacophore-based drug design". Este es un artículo en prensa, es muy sencillo y emplea un método convencional para tratar de determinar el sitio de unión de los antagonistas de A3AR. Es un artículo puramente computacional, se apoyan de los datos bibliográficos para establecer las hipótesis. Lo emplearemos como segundo ejemplo práctico.
5. (Colotta et al., 2009) "Novel potent and highly selective human A(3) adenosine receptor antagonists belonging to the 4-amido-2-arylpyrazolo[3,4-c]quinoline series: molecular docking analysis and pharmacological studies". Este artículo, también de 2009 complementa al anterior.

ESTUDIO DE LAS ESTRUCTURAS DE RECEPTORE TRANSMEMBRANA: RODOPSINAS

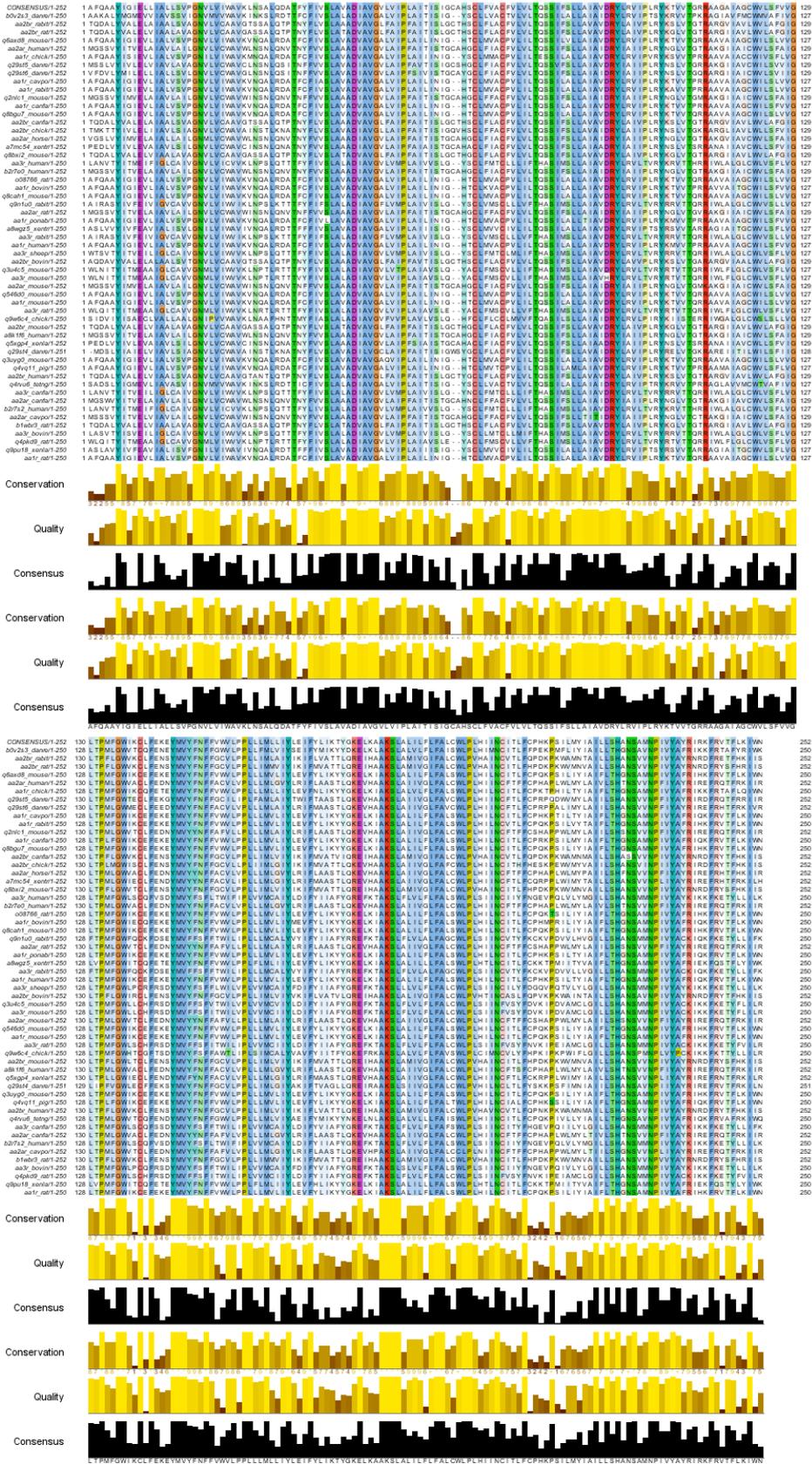


Figura 86.- Alineamiento de todos los componentes de la familia de ARs. Obtenido de GPCRDB (<http://www.gpcr.org/7tm/classes/aminoacid/mjalview/>) y modificado con jalView.

6.1.2 Importancia bioquímica del A3ARs

Fuente: (Gessi et al., 2008)

Uno de los principales retos de la biología de sistemas es entender el funcionamiento molecular del A3AR, sobre todo el mecanismo de unión de sus agonistas y antagonistas selectivos. Es un receptor huérfano, con una dualidad, o bajos niveles de expresión (casi indetectables), o elevados, ambas situaciones conducen a estados patológicos. Se supone por las evidencias experimentales disponibles hasta la fecha que se expresa en el tálamo e hipotálamo. Sin embargo en los últimos años se le ha encontrado asociado a las células neutrófilas especialmente en enfermedades inflamatorias y gran variedad de cánceres.

Principales campos de aplicación de sus agonistas y antagonistas son:

- Neuroprotección-Neurodegeneración: Se han encontrado ligandos agonistas de gran potencia (IB-MECA), cuya administración debe ser muy precisa por el efecto dual del receptor.
- Cardioprotector-Cardiotoxicidad: Regulando la actividad (o interfiriendo) de otro AR (A1AR). En la actualidad se están empleando fármacos de la serie CI-IB-MECA o MECA.
- Antiinflamatorio-proinflamatorio: Es la faceta más desconocida, se ha encontrado altos niveles de expresión en enfermedades inflamatorias, y bajos en algunas alergias.
- Antitumorigeno-Tumorigeno: Dependiendo del tipo de cáncer se encuentra sub o sobre expresado. El IB-MECA también está en proceso de ensayo para el tratamiento de algunos tumores por su capacidad de inhibición.

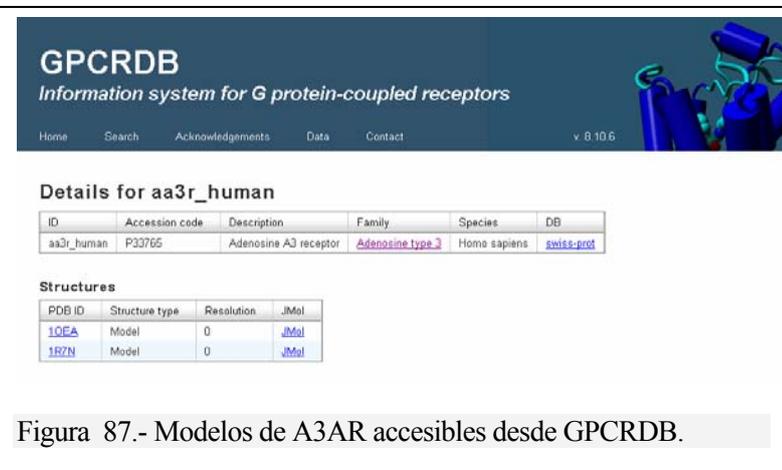
En definitiva, la regulación del A3AR mediante inhibidores y agonistas es el campo con mayor importancia farmacológica del momento por la gran cantidad de redes de señalización en las que parecen estar implicado. Su mecanismo de regulación es de vital importancia para el desarrollo de fármacos tanto agonistas como antagonistas.

6.1.3 Modelado molecular de A3AR. Estado del arte.

Fuente: (Martinelli and Tuccinardi, 2008)

Hasta el momento desde el punto de vista "bioinformático", se han empleado los métodos clásicos para el análisis de agonistas y antagonistas:

- Modelado por Homología de su estructura tridimensional a partir de las estructuras de Rodopsina Bovina.
- Comparación de los datos de mutagénesis con los ensayos de docking.
- Screening de compuestos modificados y comparación con los modelos.



GPCRDB
Information system for G protein-coupled receptors

Home Search Acknowledgements Data Contact v. 8.10.6

Details for aa3r_human

ID	Accession code	Description	Family	Species	DB
aa3r_human	P33765	Adenosine A3 receptor	Adenosine type 3	Homo sapiens	swiss-prot

Structures

PDB ID	Structure type	Resolution	JMol
1OEA	Model	0	JMol
1R7N	Model	0	JMol

Figura 87.- Modelos de A3AR accesibles desde GPCRDB.

Sin embargo, en algunos casos el comportamiento de agonistas y antagonistas es difuso y no se acaban de explicar los mecanismos moleculares de la activación – desactivación del receptor.

Hasta el momento de la revisión de Martinelli se manejaban tres modelos, uno de ellos depositado en pdb 1O74, que era el que se manejaba normalmente en los estudios de docking y screening. Actualmente en la base de datos GPCRDB se dispone de dos modelos teóricos del receptor, el ya conocido 1O74 y el 1OEA. Los datos de mutaciones existentes que puedan apoyar a los modelos teóricos son escasos. El modelo 1OEA (Gao et al., 2002) parece ser hasta el momento el más fiable.

Muy pocos estudios han facilitado información esencial sobre la activación del receptor, pero todos los análisis apuntan a la necesidad de crear un modelo en estado activado que permita contrastar con fiabilidad los ensayos de docking y screening en agonistas y sobre todo en antagonistas.

6.1.4 Estudio de los agonistas de A3AR. Description del artículo "Computer aided comparative analysis of the binding modes of the adenosine receptor agonists for all known subtypes of adenosine receptors"

Sin ser uno de los últimos artículos sobre agonistas A3AR, si que contiene un resumen claro y conciso sobre los modelos de agonistas. El artículo de Ivanov realiza una comparativa de la efectividad de toda una serie de ligandos de cuatro familias de compuestos.

Los modelos tridimensionales de los ARs los generan con MODELLER a partir de la estructura inactiva de la Rodopsina Bovina. La estructura obtenida la optimizan mediante mecánica molecular con el paquete SYBYL y la testean con PROCHEK. En la discusión advierten que quizás no es el mejor modelo para estudiar la activación de agonistas (los valores de Energía de Activación no van a estar correlacionados). En los estudios de docking utilizan el comando Dock del paquete SYBYL (no dan más explicaciones).

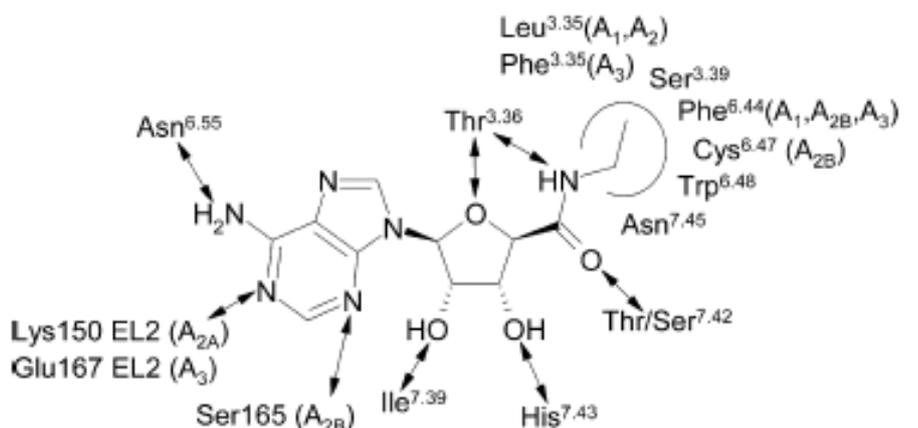


Fig. 3. The putative binding mode of 5'-N-alkylcarboxamidoadenosines: (↔) hydrogen bonds and (-) hydrophobic interactions.

Figura 88.- Modelo de interacción del NECA con los ARs

La principal conclusión del artículo es que los sitios de unión de los ARs son equivalentes entre ellos y equivalentes al de la Rodopsina Bovina con el retinal. Y dan una relación de aminoácidos que interactúan con los ligandos. Como caso genérico de A3AR, proponen el ejemplo del NECA (Figura 88.- Modelo de interacción del NECA).

Adenosine receptors agonists used for molecular docking studies

No.	St	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X	K _i (nM)			EC ₅₀ (μM)	K _i (nM)
							A ₁	A _{2A}	A _{2B}		
1	Adenosine	H	H	-	-	-	0.31 ^a [69]	0.73 ^a [67]	23.5 [67]	0.29 ^a [67]	
2	NECA	H	H	-	Et	O	14 [65]	20 [65]	2.4 [63], 6.2 [72]	10.6 [62], 0.76 [71]	
3	NCPA	H	H	-	<i>c</i> -Pr	O	63 ^a [62]	12 ^a [62]	5.3 [70]	108 [62]	
4	MECA	H	H	-	Me	O	1084 ^a [62]	330 ^a [62]	45 [62]	6.4 [62]	
5		H	H	-	<i>c</i> -Bu	O	43 ^a [62]	130 ^a [62]	33 [62]	23 [62]	
6		H	H	-	Et	S	141 ^a [62]	130 ^a [62]	16 [62]	569 [62]	
7		H	H	-	<i>c</i> -Pr	S	137 ^a [62]	130 ^a [62]	13 [62]	2280 [62]	
8	CPA	<i>c</i> -C ₆ H ₅	H	-	-	-	2.2 [63]	794 [63]	18.6 [63]	43 [63]	
9		Ph	H	-	-	-	30 ^a [71]	58 ^b [71]	6.3 [71]	140 [71]	
10	<i>R</i> -PIA	CH(Me)CH ₂ Ph	H	-	-	-	2.0 [63]	8.59 [63]	11.2 [63]	16.3 [63]	
11	SPA	Ph- <i>p</i> -SO ₂ H	H	-	-	-	1400 ^a [63]	4700 ^a [63]	14 [63]	340 [63]	
12		CH ₂ Ph	H	-	-	-	-	-	96 [73]	-	
13		Ph- <i>p</i> -Cl	H	-	-	-	40 ^a [71]	570 ^a [71]	1.1 [71]	37 [71]	
14		Ph- <i>p</i> -Br	H	-	-	-	18 ^a [71]	480 ^a [71]	1.3 [71]	56 [71]	
15		Ph- <i>p</i> -I	H	-	-	-	20 ^a [71]	710 ^a [71]	0.37 [71]	31 [71]	
16		Ph- <i>p</i> -COOH	H	-	-	-	270 ^a [71]	2500 ^a [71]	8.0 [71]	210 [71]	
17		Ph- <i>p</i> -SO ₂ NH ₂	H	-	-	-	30 ^a [71]	508 ^{b,c} [71]	0.44 [74]	37 [71]	
18		Ph- <i>p</i> -CONH ₂	H	-	-	-	20 ^a [71]	6.58 ^{b,c} [71]	1.4 [74]	84 [71]	
19		Me	H	-	Et	O	-	-	19 [63]	-	
20		Ph	H	-	Et	O	32 ^a [71]	634 ^a [71]	2.4 [71]	41 [71]	
21		Ph- <i>p</i> -Cl	H	-	Et	O	30 ^a [71]	183 ^a [71]	0.73 [71]	64 [71]	
22		Ph- <i>p</i> -I	H	-	Et	O	17 ^a [71]	468 ^{b,c} [71]	1.9 [71]	7.6 [71]	
23	2-ClAdo	H	Cl	-	-	-	9.3 ^a [75]	63 ^a [75]	24 [63], 8.9 [40]	1890 ^a [7.5]	
24	HEAdo	H	-	Bu	-	-	18 [20]	5.7 [20]	100 [20]	4.7 [20]	
25	(<i>R</i>)	H	-	CH(OH)Ph	-	-	0.44 [20]	29 [20]	6.2 [20]	5.0 [20]	
	PHPAdo										
26	(<i>S</i>)	H	-	CH(OH)Ph	-	-	0.67 [20]	1.8 [20]	0.92 [20]	1.4 [20]	
	PHPAdo										
27	(<i>R,S</i>)	Me	-	CH(OH)Ph	-	-	8.4 [20]	273 [20]	2.7 [20]	0.76 [20]	
28	(<i>R,S</i>)	Et	-	CH(OH)Ph	-	-	2.7 [20]	94 [20]	1.7 [20]	0.97 [20]	
29	(<i>R,S</i>)	<i>i</i> -Pr	-	CH(OH)Ph	-	-	1.5 [20]	96 [65]	6.1 [20]	2.3 [20]	
30		H	-	Bu	Et	O	60 [64]	6.4 [64]	6.1 [64]	2.4 [64]	
	HENECA										
31		H	-	4-thiazolyl	Et	O	12 [65]	84 [65]	4.6 [65]	3.7 [65]	
32	(<i>R</i>)	H	-	CH(OH)Ph	Et	O	1.9 [65]	39 [65]	2.4 [20]	5.5 [65]	
	PHPNECA										
33	(<i>S</i>)	H	-	CH(OH)Ph	Et	O	2.1 [65]	2.0 [65]	0.22 [20]	0.75 [65]	
	PHPNECA										
34	(<i>R,S</i>)	H	-	C(OH)MePh	Et	O	9.4 [65]	56 [65]	2.3 [65]	2.4 [65]	
35	(<i>R,S</i>)	H	-	CH ₂ CH(OH)Me	Et	O	40 [65]	14 [65]	13.3 [68]	4.1 [68]	
36	(<i>R,S</i>)	H	-	CH(OH)Et	Et	O	4.1 [68]	3.1 [68]	1.3 [68]	1.0 [68]	
37	(<i>R,S</i>)	H	-	CH(OH)Ph	Me	O	14 [68]	3.0 [68]	5.0 [68]	1.7 [68]	
	PHPMECA										
38			F	-	-	-	0.9 [17]	71.9 [17]	-	-	

Figura 89.- Relacion de compuestos empleados en el artículo de Ivanov.

6.1.5 Estudio de los antagonistas de A3AR. Description de los artículos de Wei y Colota sobre docking de triazopurinas, imidazopurinas pirrolopurinas, quinazolininas y arilpirazoquinazolininas.

Los dos artículos son similares, a fecha de hoy el de Wei aun está en prensa, aunque es accesible desde la Web. Ambos llegan a las mismas conclusiones aunque su objetivo es distinto, por ser familias de compuestos distintas.

El artículo de Wei, "Molecular docking study of A3 adenosine receptor antagonists and pharmacophore-based drug design", tiene como objetivo desarrollar un modelo farmacológico a partir del estudio de la interacción ligando receptor de antagonistas selectivos de A3AR (Figura 90), basándose en un conjunto de triazopurinas, imidazopurinas, pirrolopurinas y quinazolininas

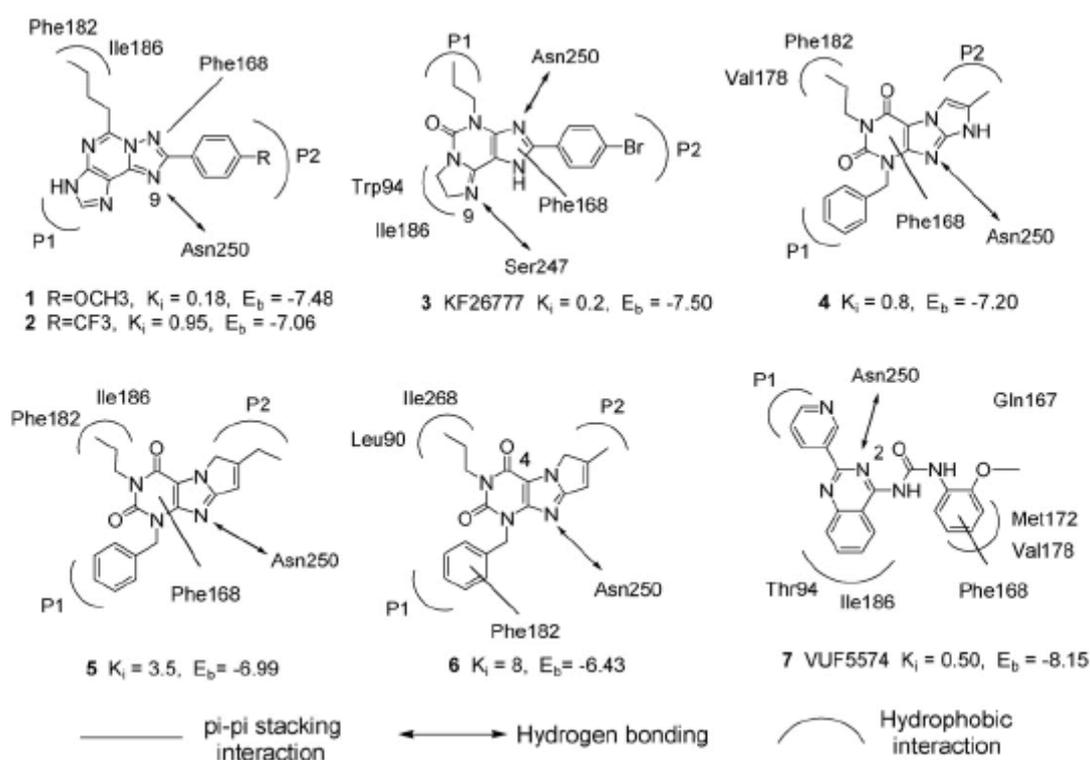


Figura 90.- Numeración de los compuestos antagonistas objeto del cálculo.

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=60602>

Para los cálculos parten de la estructura 1OEA del PDB, a la que no realizan ninguna optimización. El software de docking que emplean es Autodock 4. Los resultados de los sitios de unión se resumen en la Figura 90.

Con los resultados de docking, generan un cluster de farmacóforo que emplean para generar una librería de compuestos potenciales antagonistas de A3AR, en esta parte emplean el software CATALYST.

Colotta emplea como punto de partida un set de ligandos de la familia de las arilpirazoquinazolininas. El contenido del artículo es mixto, tiene una parte de síntesis química y medida de las constantes de equilibrio y otra computacional. En la parte computacional hacen un estudio de docking de los

compuestos de partida, crean un farmacóforo, sintetizan químicamente los compuestos potenciales antagonistas y miden experimentalmente su constante de equilibrio. Es decir el artículo tiene un ciclo completo de desarrollo de fármacos.

El farmacóforo que proponen coincide con el propuesto por Wei. Los ligandos adoptan distintas posiciones en el hueco formado por los residuos 90LEU - 91LEU - 94THR - SER165 - 167GLN - 168PHE - 172MET - 182PHE - 243TRP - 246LEU - 247SER - 250ASN - 253ILE - 268ILE - 271SER - 272HIS.

El artículo se complementa con una asombrosa correlación entre los pK experimentales y la puntuación de docking.

6.2 Replanteando el problema, materiales métodos y objetivos.

Hemos comprobado en el caso de la mGLUR1 que construir un modelo funcional de receptor no es sencillo, pero en este caso la identidad de las secuencias entre la rodopsina y el A3AR facilita la tarea de la construcción de un modelo en estado activado y otro en estado inactivo. Teóricamente el modo de interacción del ligando con cada uno de los modelos puede dar pistas sobre el mecanismo de regulación del A3AR, hasta el momento muy difuso en la bibliografía.

En este caso práctico nos centraremos en:

- Generar dos estructuras de A3AR partiendo de las estructuras activa e inactiva de la rodopsina (2i36 y 2i37). Con estas dos estructuras junto con la 1OEA, testaremos los juegos de ligandos agonistas y antagonistas de los artículos de Ivanov y Wei. Con el juego de ligandos de Ivanov (47 ligandos), intentare un experimento de screening basado en la estructura 1OEA y en el espacio de búsqueda que determinemos usando la Adenosina como modelo.
- Dado que el IB-MECA es un fármaco de nuevo desarrollo sobre el que se están realizando numerosos estudios, comprobaremos.
- Como caso particular de antagonista incluiremos a la nigulpiridina.

Los medios serán básicamente los mismos que en el caso anterior:

- HOMMER para generar las estructuras y PROCHEK para comprobarlas.
- ArgusLab, Autodock (DockingServer), y una versión de prueba de Molegro para hacer los cálculos de docking.

Los objetivos finales son:

- Contrastar los sitios de unión obtenidos por diferentes programas de docking con los de los artículos de referencia.
- Comparar y evaluar los modelos activo e inactivo frente al 1OEA, las diferencias de docking observadas.
- Evaluar la potencia del docking dirigido a la estructura (no búsqueda por farmacóforo).

6.3 Modelado de las proteínas en estado activo e inactivo.

A efectos de modelar la estructura, y relacionar los aminoácidos que vayan a interaccionar con las A3AR he realizado el siguiente alineamiento de las secuencias de rodopsina, pdb: 1f88, 2i36A, 2i37A, y las secuencias de A3AR de rata, vaca y humano.



Figura 91.- Alineamiento de las secuencias de A3AR y rodopsina. Realizado con la utilidad remota de CLUSTALW implementada en JalView. Encuadrados en amarillo están los aminoácidos que según la bibliografía tienen mayor posibilidad de interacción con el ligando.

Una vez realizados los alineamientos seguimos el procedimiento de la sección 5.3.3 (HOMMER, incluyendo una optimización de los loops extracelulares), y obtenemos las dos proteínas en estado activo e inactivo. La proteína en estado inactivo la denominaremos A3AR_2i36, y a la proteína activa A3AR_2i36..

6.3.6 Revisión de las estructuras con Procheck

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, revisamos ambas estructuras con Prochek.:

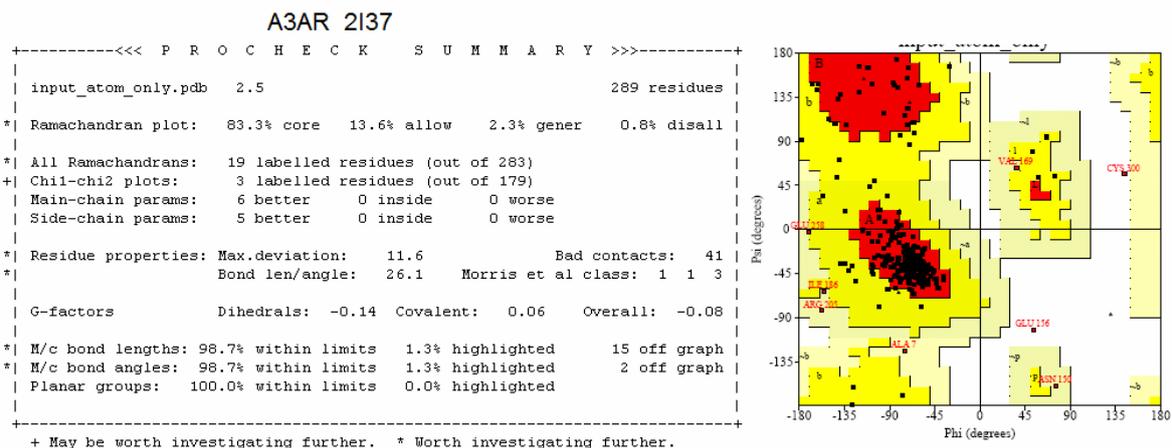


Figura 92.- Informe de Procheck de la estructura A3AR_2i37.

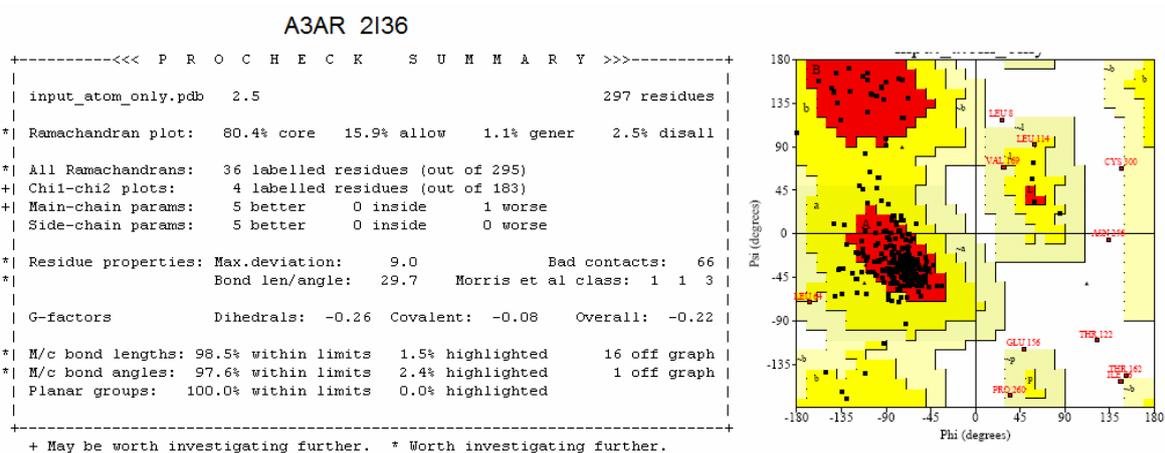


Figura 93.- Informe de procheck de la estructura A3AR 2I37.

Los resultados de Procheck nos indican que la estructura A3AR_2i36, tiene más impedimentos estéricos que la A3AR_2i37. En concreto, el porcentaje de punto fuera es de 0.8 frente a 2.5%. Dado que los cálculos de docking los haré permitiendo girar a los aminoácidos del sitio de unión (suele ser lo normal), en ese momento se producirá la optimización.

En la estructura A3AR_2i36 hay un enlace roto y varios aminoácidos que les faltan oxígenos (en las figuras no aparece este dato). Antes de pasarlos a doking los reparo con la utilidad de reparación de Molegro.

6.3.7 Comparación de las estructuras.

Como en el caso de la mGLUR1, las estructuras activa e inactiva son bastante similares no obstante si que se observan pequeños desplazamientos entra ellas casi imperceptibles. En la Figura 94 comprobamos (es difícil de ver;) que A3AR_2i36 esta entre A3AR_2i37 1OEA, esta última se puede comprobar en la imagen que esta como apretada por la parte central (como un fardo de paja).

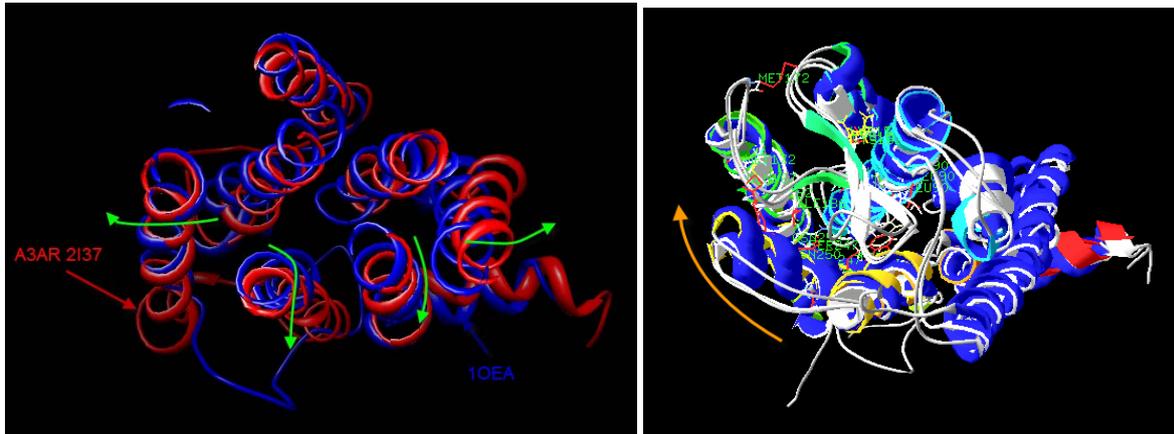


Figura 94.- Desplazamiento de las hélices en A3AR respecto de 1OEA. En la figura de la derecha están las tres estructuras superpuestas, la más interior es la 1OEA, seguidas de A3AR_2i36 y A3AR_2i37. Se aprecia como se “apretuja” como un fardo de paja.

En la Figura 96 y Figura 95, se aprecia como el loop EC2 se levanta hacia arriba en las dos estructuras por homología, mientras que en 1OEA permanece junto al paquete de hélices. El aminoácido con mayor implicación es MET172 que puede quedar fuera del espacio de interacción. Sin embargo el aminoácido equivalente (Figura 96 , imagen de la izquierda) en las estructuras de Rodopsina empleadas como patrón este aminoácido está en idéntica posición que sus equivalentes en las estructuras modeladas.

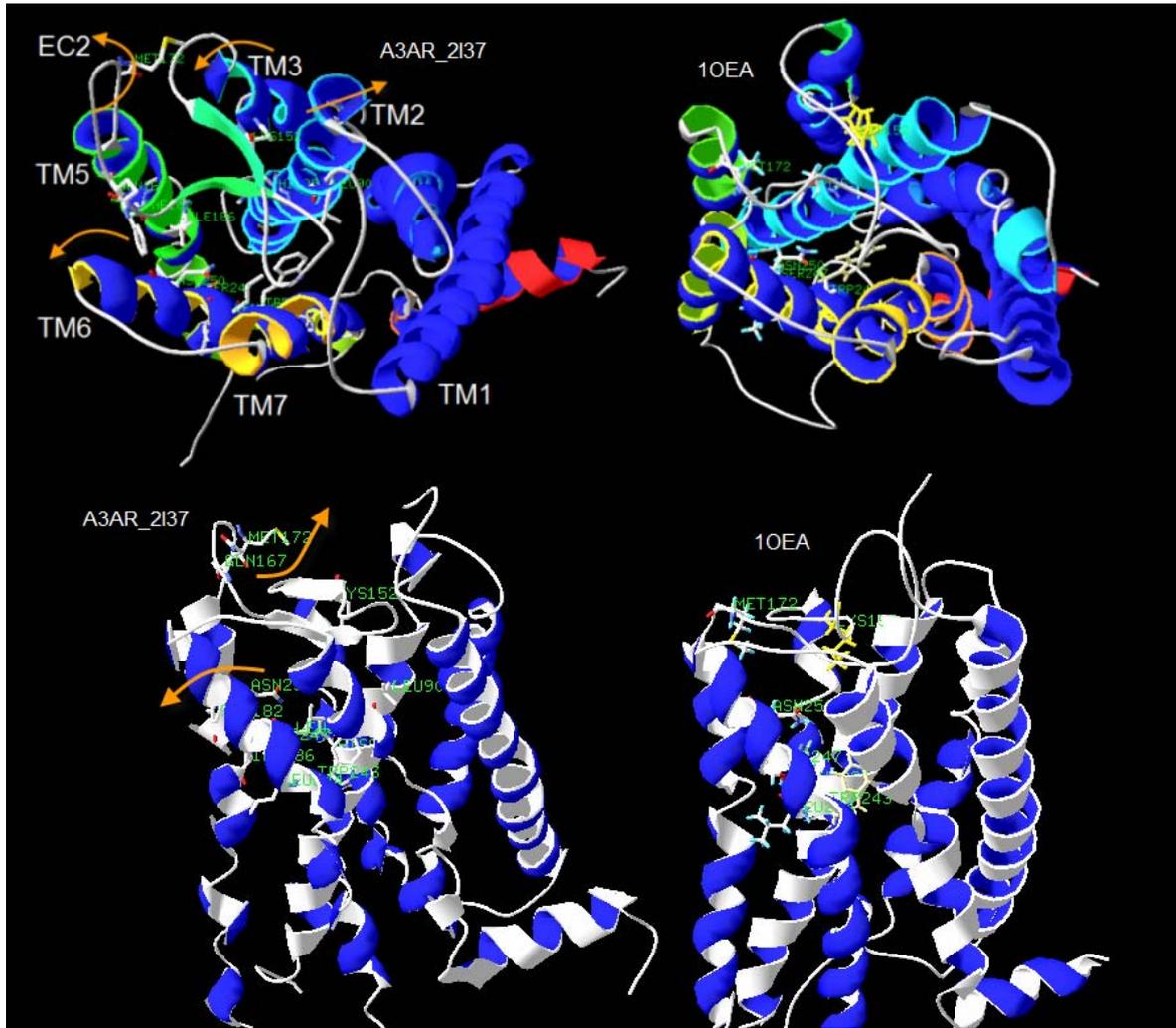


Figura 95.- Detalle de la comparación de 10EA con A3AR_2i37. Las flechas naranjas indican los desplazamientos de las hélices observados.

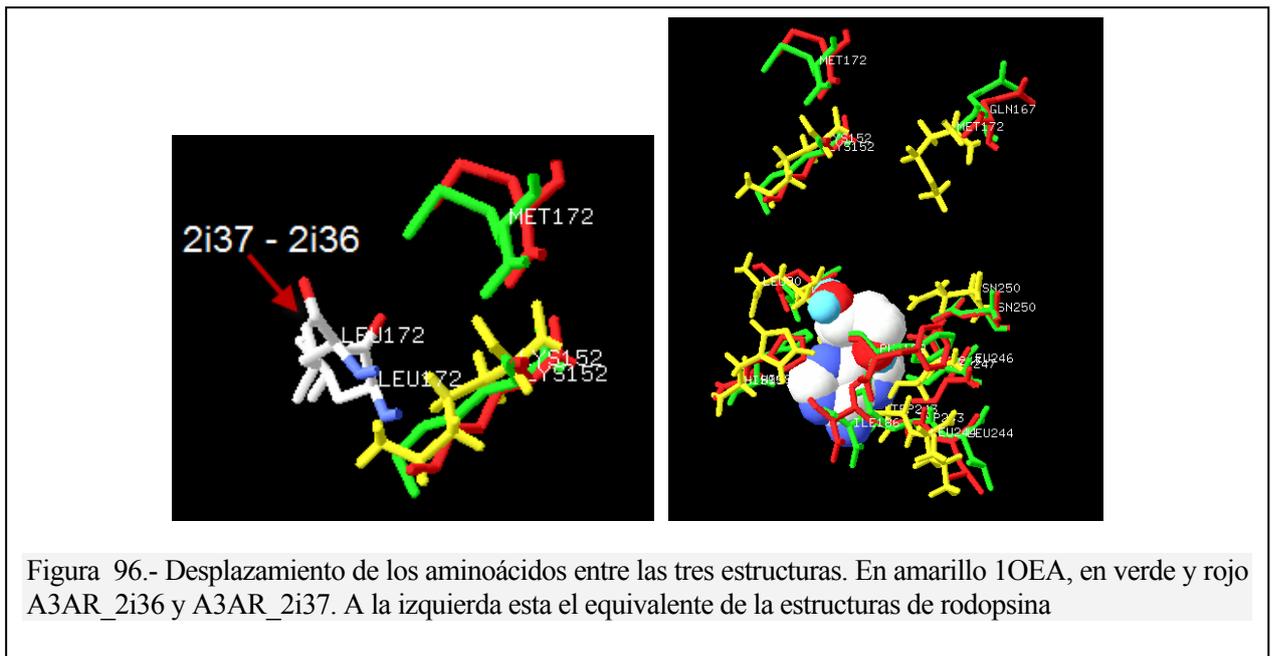


Figura 96.- Desplazamiento de los aminoácidos entre las tres estructuras. En amarillo 10EA, en verde y rojo A3AR_2i36 y A3AR_2i37. A la izquierda esta el equivalente de la estructuras de rodopsina

6.4 Preparando la proteína con DockingServer

6.4.8 Selección del espacio de búsqueda

El espacio de búsqueda del sitio de unión de los ligandos ha fijado teniendo en cuenta los valores experimentales de Ivanov. Los resultados de SDM indican que los aminoácidos importantes son: TRP43, ILE186, LEU90, LEU246, MET172, TYR254, PHE182, MET172, TYR152, ASN250, SER247, PHE168, GLN167, TRP243, HIS95, LEU244.

Desde la interface de Docking Server seleccionamos los siguientes parámetros iniciales:

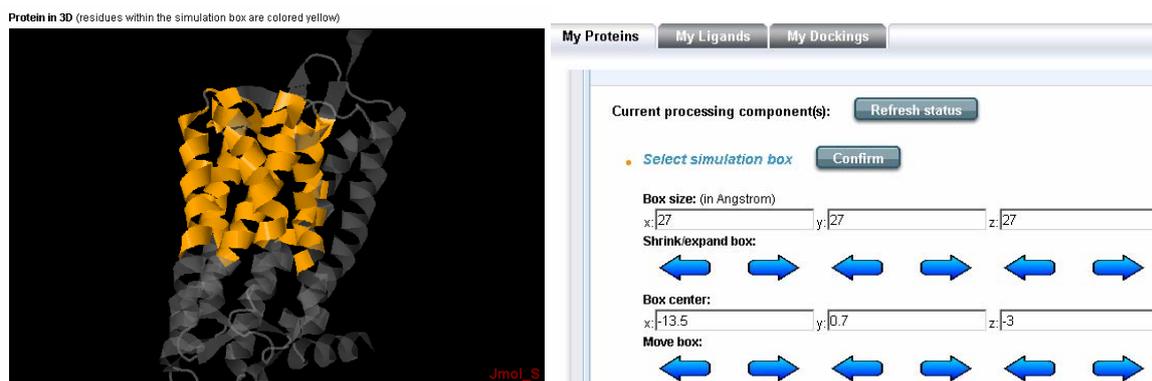


Figura 97. Selección del espacio de búsqueda de 1OEA en DockingServer.

Mediante las casillas de visualización comprobamos que todos los aminoácidos de la lista entran dentro de la caja. La selección de los aminoácidos fue la siguiente:

Selected amino acids:

1	M	P	N	N	S	T	A	L	S	L	A	N	V	T	Y	I	T	M	E	I	-20
21-	F	I	G	L	C	A	I	V	G	N	V	L	V	I	C	V	V	K	L	N	-40
41-	P	S	L	Q	T	T	T	F	Y	F	I	V	S	L	A	L	A	D	I	A	-60
61-	V	G	V	L	V	M	P	L	A	I	V	V	S	L	G	I	T	I	H	F	-80
81-	Y	S	C	L	F	M	T	C	L	L	L	I	F	T	H	A	S	I	M	S	-100
101-	L	L	A	I	A	V	D	R	Y	L	R	V	K	L	T	V	R	Y	K	R	-120
121-	V	T	T	H	R	R	I	W	L	A	L	G	L	C	W	L	V	S	F	L	-140
141-	V	G	L	T	P	M	F	G	W	N	M	K	L	T	S	E	Y	H	R	N	-160
161-	V	T	F	L	S	C	Q	F	V	S	V	M	R	M	D	Y	M	V	Y	F	-180
181-	S	F	L	T	W	I	F	I	P	L	V	V	M	C	A	I	Y	L	D	I	-200
201-	F	Y	I	I	R	N	K	L	S	L	N	L	S	N	S	K	E	T	G	A	-220
221-	F	Y	G	R	E	F	K	T	A	K	S	L	F	L	V	L	F	L	F	A	-240
241-	L	S	W	L	P	L	S	I	I	N	C	I	I	Y	F	N	G	E	V	P	-260
261-	Q	L	V	L	Y	M	G	I	L	L	S	H	A	N	S	M	M	N	P	I	-280
281-	V	Y	A	Y	K	I	K	K	F	K	E	T	Y	L	L	I	L	K			

Figura 98.- Selección de los aminoácidos del espacio de búsqueda de 1OEA.

Con esta configuración se obtuvo una pose más favorecida de la Adenosina en su interacción con 1OEA (Figura 99).

6.4.9 Testeando la posición del ligando Adenosina en 1OEA

En una primera aproximación se hizo docking con un espacio de búsqueda que englobaba la parte superior de 1oea con la adenosina para comprobar en donde se situaba el ligando.

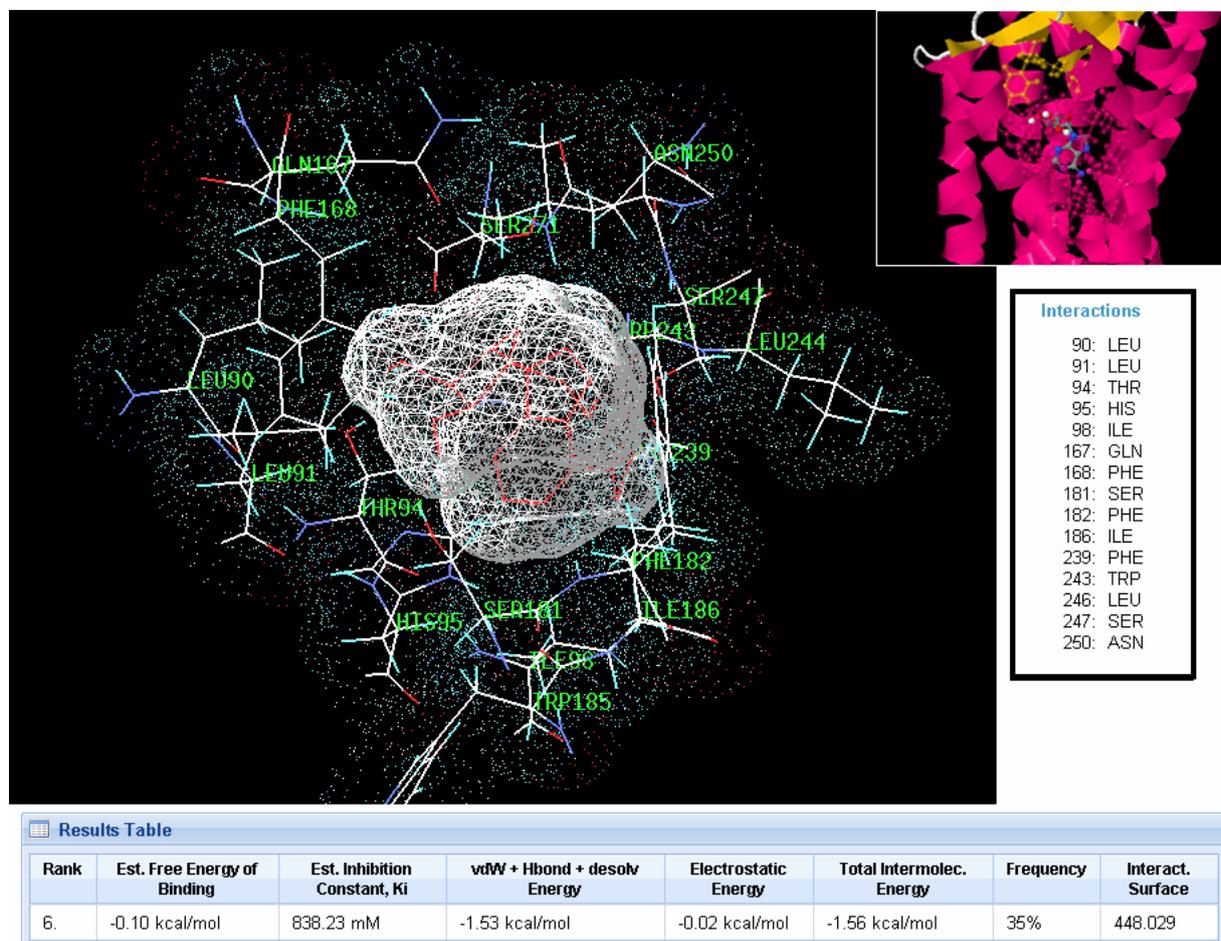


Figura 99.- Posición que adopta la adenosina en el interior de 1OEA. Imagen generada con SwissPdbViewer y jMol. En la imagen principal se han seleccionado los aminoácidos de la cadena que "envuelven" a la adenosina. Se presenta la energía de interacción más favorable.

El resultado concuerda con los reseñados en la bibliografía: TRP243, ILE186, LEU90, LEU246, MET172, TYR254, PHE182, ASN250, SER247, PHE168, GLN167, HIS95, LEU244. En verde marcados los que coinciden.

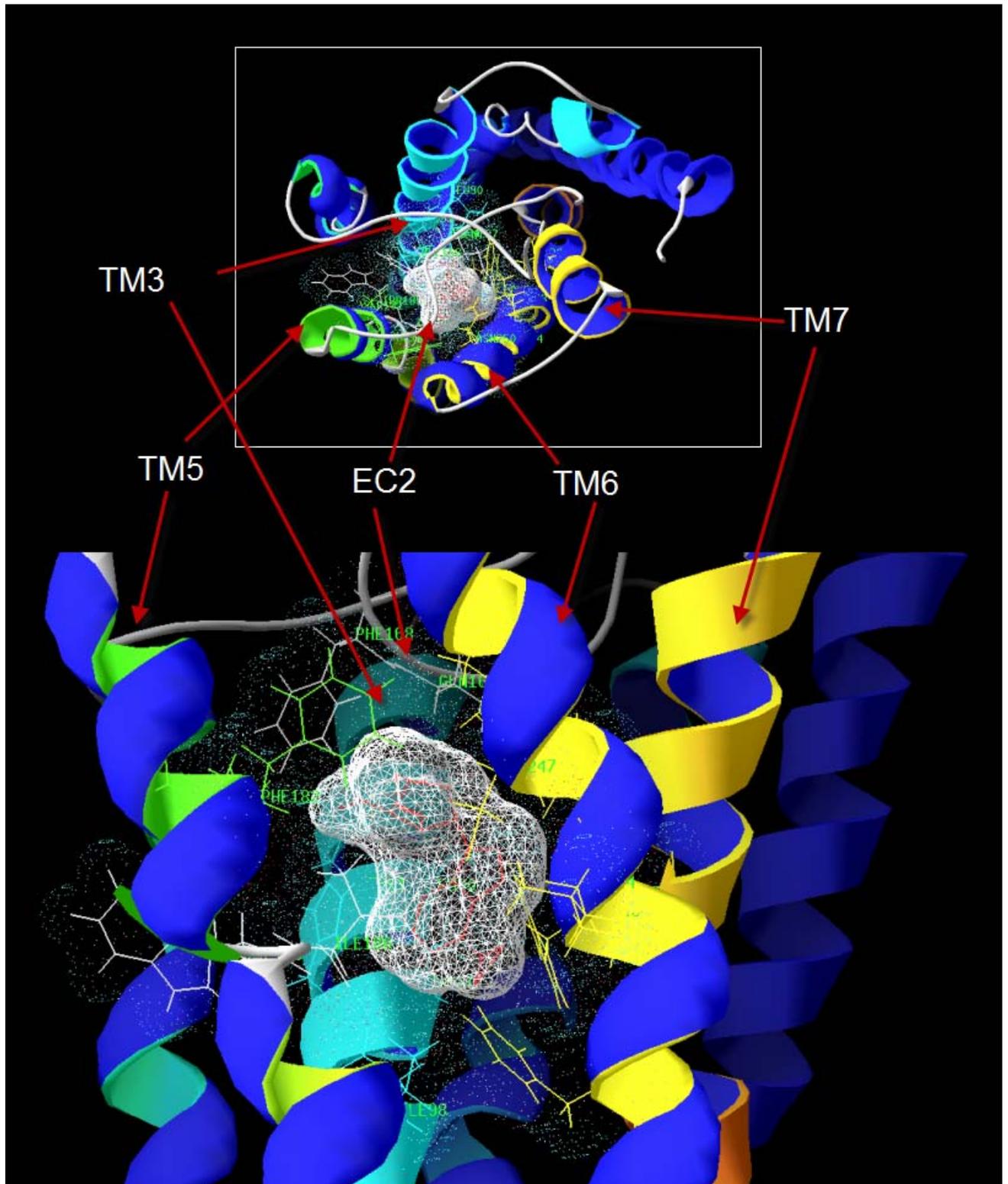


Figura 100.- Detalle de las interacciones de la Adenosina con A3AR (1OEA).- La adenosina en rojo está incluida en su superficie molecular (gris blanco). Los aminoácidos están coloreados por su TM. La superficie puntada, es la generada por los aminoácidos cercanos a la adenosina. Imagen generada con SwisPdbViewer.

6.4.10 Optimización de la pose más favorable de la Adenosina con A3AR (1OEA)

A partir de la primera pose que coincide con los datos bibliográficos, genero poses optimizadas a partir de esta. Los parámetros resultantes de estas se utilizarán para el resto de cálculos que realizare con todos los ligandos de A3AR.

Optimización con DickingServer/AutoDock

Una hemos comprobado que los aminoácidos que interaccionan con la Adenosina en una primera aproximación son correctos, he procedido a optimizar la pose con un espacio de búsqueda más reducido en DockingServer. El resultado de la optimización produce una mejora considerable de los valores de la energía hasta -6.73 kcal/mol, véase la Figura 101. No obstante, las interacciones con los aminoácidos siguen siendo las mismas Figura 102.

Adenosine to 1OEA

Rank	Est. Free Energy of Binding	Est. Inhibition Constant, Ki	$\Delta G_{\text{WT}} + \text{Hbond} + \text{desolv Energy}$	Electrostatic Energy	Total Intermolec. Energy	Frequency	Interact. Surface	Download
1.	-6.73 kcal/mol	11.70 uM	-6.67 kcal/mol	-0.06 kcal/mol	-6.74 kcal/mol	20%	442.883	download
2.	-6.21 kcal/mol	27.83 uM	-7.14 kcal/mol	-0.13 kcal/mol	-7.26 kcal/mol	13%	465.128	download
3.	-6.10 kcal/mol	33.87 uM	-7.03 kcal/mol	-0.14 kcal/mol	-7.16 kcal/mol	18%	458.341	download
4.	-5.98 kcal/mol	41.11 uM	-6.84 kcal/mol	-0.07 kcal/mol	-6.91 kcal/mol	31%	459.754	download
5.	-5.06 kcal/mol	196.95 uM	-5.50 kcal/mol	-0.04 kcal/mol	-5.54 kcal/mol	1%	447.99	download
6.	-4.41 kcal/mol	583.57 uM	-4.44 kcal/mol	-0.02 kcal/mol	-4.46 kcal/mol	11%	471.014	download
7.	-3.98 kcal/mol	1.21 mM	-4.24 kcal/mol	-0.04 kcal/mol	-4.27 kcal/mol	5%	453.033	download
8.	-3.45 kcal/mol	2.95 mM	-3.28 kcal/mol	-0.01 kcal/mol	-3.29 kcal/mol	1%	438.441	download

Figura 101.- Resultados finales de la optimización del espacio de búsqueda de la pose más favorecida de la Adenosina con la estructura A3AR (1OEA).

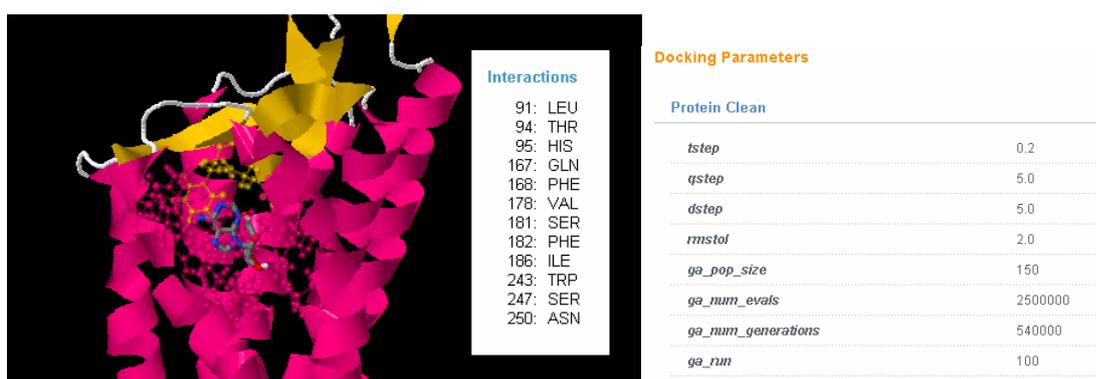


Figura 102.- Vista de la pose 1 (figura anterior). A la derecha parámetros de docking optimizados. Imagen de Jmol

Podemos comprobar que **todos los aminoácidos señalados en la Figura 102 son los indicados en amarillo en el alineamiento de la Figura 91**. El valor de Ki para el complejo de la adenosina con el A3AR es de 0.29 nM, mientras que el valor calculado con esta estructura es de 11.7 uM

Metodo computacional con Docking Server:

Docking calculations were carried out using DockingServer (<http://www.dockingserver.com>). The Dreiding force field (Mayo, 1990) was used for energy minimization of ligand molecule using built-in Chemaxon tools in DockingServer. Gasteiger partial charges were added to the ligand atoms. Non-polar hydrogen atoms were merged, and rotatable bonds were defined. Docking calculations were carried out on **1OEA** protein model. Essential hydrogen atoms, Kollman united atom type charges, and solvation parameters were added with the aid of AutoDock tools (Morris, Goodsell et al., 1998). Affinity (grid) maps of 27×27×27 Å grid points and 0.375 Å spacing were generated using the Autogrid program (Morris, Goodsell et al., 1998). AutoDock parameter set- and distance-dependent dielectric functions were used in the calculation of the van der Waals and the electrostatic terms, respectively.

Docking simulations were performed using the Lamarckian genetic algorithm (LGA) and the Solis & Wets local search method (Solis and Wets, 1981). Initial position, orientation, and torsions of the ligand molecules were set randomly. Each docking experiment was derived from 100 different runs that were set to terminate after a maximum of 2500000 energy evaluations. The population size was set to 150. During the search, a translational step of 0.2 Å, and quaternion and torsion steps of 5 were applied.

References

- Hazai, S. Kovacs, L. Demko, Z. Bikadi
 DockingServer (www.dockingserver.com)
 Virtua Drug Ltd., Budapest, Hungary
 T. A. Halgren
 Representation of Vanderwaals (Vdw) Interactions in Molecular Mechanics Force-Fields - Potential Form, Combination Rules, and Vdw Parameters
 Journal of the American Chemical Society **114** (20), 7827-7843 (1992)
 Morris, G. M., D. S. Goodsell, et al.
 Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function
 Journal of Computational Chemistry **19** (14), 1639-1662 (1998)
 F. J. Solis and R. J. B. Wets
 Minimization by Random Search Techniques
 Mathematics of Operations Research **6** (1), 19-30 (1981)
 P. F. W. Stouten, C. Frommel, et al.
 An Effective Solvation Term Based on Atomic Occupancies for Use In Protein Simulations
 Molecular Simulation **10** (2-6), 97- (1993)

Optimización con ArgusLab

Para contrastar el valor de la energía repetimos el cálculo con ArgusLab. Para ello exportamos la pose 1 junto con la proteína a un pdb con dos capas, para que se mantenga la conformación. En base a esta conformación optimizamos la postura. El valor de la energía resultante es de -7.05 kcal/mol (48 nM) (Figura 103)

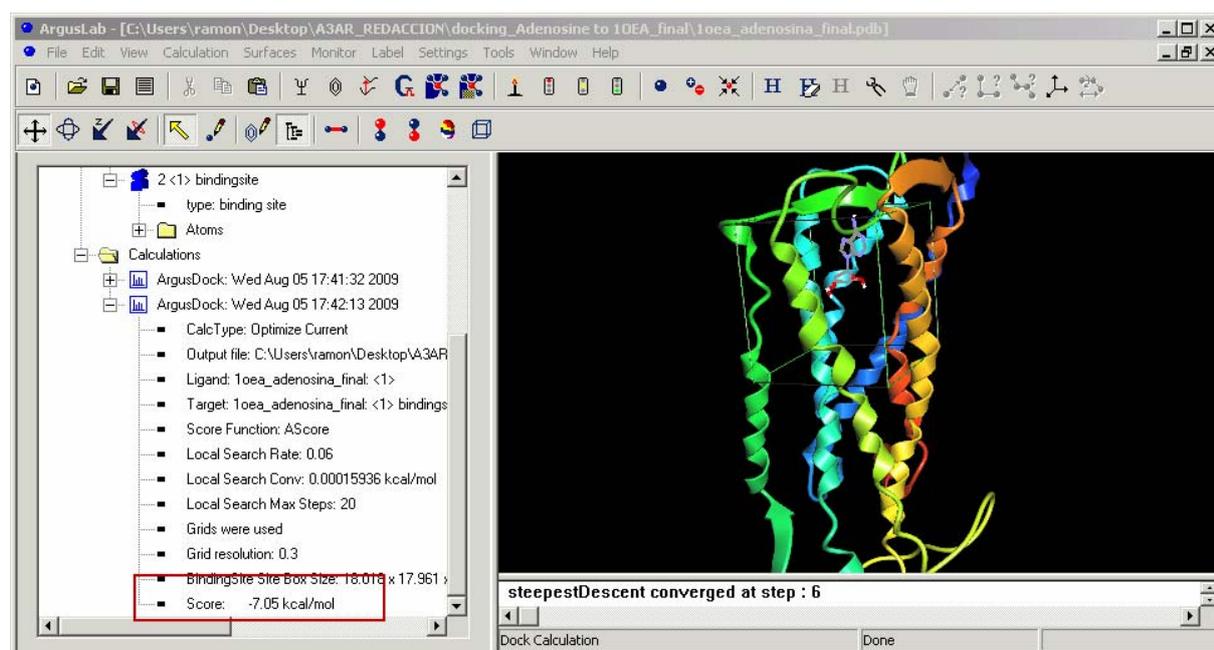


Figura 103.- Optimización de la pose de la Adenosina en A3AR con 1OEA con ArgusLab, partiendo de la pose optimizada con DockingServer.

Optimización con Molegro

Para realizar los experimentos de docking con Molegro he seleccionado la pose más favorecida de la adenosina, encontrada por autodock y se ha creado un espacio de búsqueda optimizado para esa posición.

La cavidad más favorable encontrada con Molegro coincide con la posición de la adenosina en 1OEA. En la Figura 104, se aprecia la cavidad de docking en verde brillante. La esfera verde es el espacio de búsqueda, y las bolas negras la conformación de rotámeros de los aminoácidos que están en la región.

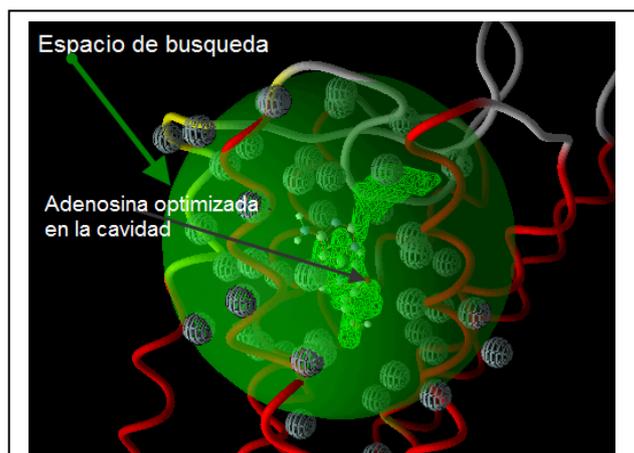


Figura 104 - Espacio de búsqueda optimizado para

Residuo	Energía de interacción (Unidades Molegro)
ASN250	-298.078
PHE182	-782.701
SER170	-782.621
VAL169	-605.865
TYR254	-462.233
VAL178	-439.237
LEU264	-394.638
VAL171	-377.366
SER155	-368.551
MET172	-35.568

Tabla 10.- Relación de aminoácidos con mejor energía de interacción con 1OEA. En verde los que coinciden con los obtenidos por autodock

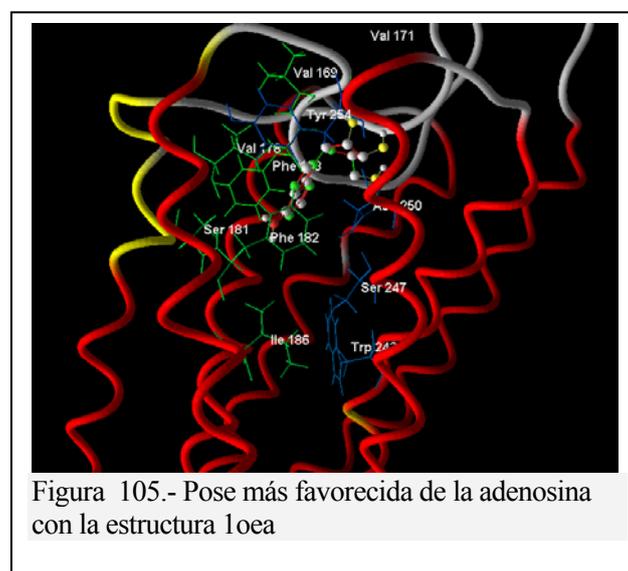


Figura 105.- Pose más favorecida de la adenosina con la estructura 1OEA

La relación de aminoácidos con menor energía de interacción coincide parcialmente con la obtenida mediante AutoDock. Ambos programas no identifican como la mejor a la misma pose. En este caso, la adenosina se sitúa justo debajo de EC2, mientras que en autodock esta desplazada hacia el interior de las hélices.

6.5 Resultados de Docking con ligandos Agonistas con 1OEA, comparación de Autodock. ArgusLab y Molegro.

De una selección de ligandos de artículo de Ivanov ((Ivanov et al., 2007)) se han calculado las energías totales de interacción con los parámetros de docking expuestos anteriormente, usando la estructura 1OEA.

ENERGIAS DE INTERACCIÓN DE LIGANDOS AGONISTAS CON 1OEA					
		AutoDock (kcal/mol)	ArgusLab (kcal/mol)	Molegro (DockScore)	pK exp
	Adenosine	-6.73	-5.4	-145.17	24,26
TIPO 1	N6-Benzyladenosine	NC	-10.23 (*)	-120,24	18,08
	N6- (4- Bromophenyl)adenosine	NC	-9.11 (*)	-116,48	19,59
	N6- (4- Sulfofenyl)adenosine (SPA)	-7.65	-6.44	-144,41	17,20
	N6-(R)-Phenylisopropyladenosine (R-PIA)	-9.26	-6.66	-132,86	20,23
	5'-N-Methylcarboxamidoadenosine (MECA)	-6.53	-6.96	-134,30	21,17
TIPO 3	5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine (NECA)	-6.87	-6.85	-129,93	23,30
	5'-N-Cyclopropylcarboxamidoadenosine (NCPCA)	-7.06	-5.88	-153,40	18,34
	IB-MECA	-10.16	-7.11(-8.9**)	-164,15	8.9-8.0 (***)

Tabla 11.- Resultados de los experimentos de docking. Los valores experimentales de pK son los citados en el artículo de Ivanov. (*) Para obtener estos valores se modifico el espacio de búsqueda de arguslab y la conformación de rotámeros. (**)Para comprobar el efecto de añadir rotámeros extra se recalcula este valor para IB-MECA. (***) Valores extraídos de <http://www.iuphar-db.org/GPCR/ReceptorDisplayForward?receptorID=2172>

Como caso particular y característico de los agonistas, he introducido el caso del IB-MECA como agonista modelo (<http://www.biomedcentral.com/1471-2210/8/20>), un fármaco de nueva generación que esta en la tercera fase antes de su salida al mercado. Este fármaco esta siendo profundamente estudiado a todos los niveles debido a su extremado potencial el tratamiento del cáncer y de las afecciones reumatoides crónicas. Hay estudios que muestran que incrementa los efectos del Metotrexato (<http://es.wikipedia.org/wiki/Metotrexato>) en el tratamiento de la artritis reumatoide (ver (Gessi et al., 2008) para un resumen detallado). Como podemos comprobar en la tabla es el que mayor valor de energía de interacción presenta de todos los ligandos analizados.

Los valores de energía total de interacción obtenidos se muestran en la Tabla 11. La correlación entre los valores de energía y el pK experimental se muestra en Figura 106.

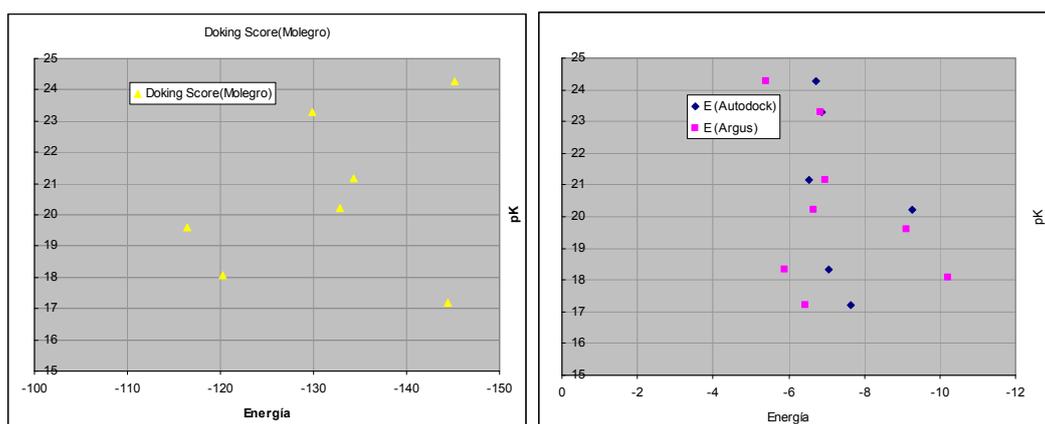


Figura 106.- Correlación entre la energía total y el pK experimental para Molegro (izquierda) y AutoDock y ArgusLab (derecha).

Hay que resaltar que ni para el “N-6-Benzyladenosine” ni para el “N6- (4-Bromophenyl)adenosine”, se obtenían resultados aceptables de energía con los valores preestablecidos para la adenosina, por lo que hubo que modificar los parámetros del cálculo. En concreto se aumento el espacio de búsqueda (30x20x30), se disminuyo a 0.25 el espaciado del grid, se aumento el número de rótamelos del ligando en n+1. Bajo estas condiciones los ligandos enlazaron con el receptor. Hay que tener en cuenta que estos valores no son comparables con el resto, ya que han sido calculados bajo condiciones diferentes de optimización. Como se puede comprobar en la Figura 107, su volumen es mayor que el de la adenosina, y adoptan una posición paralela a las hélices. A pesar de su volumen la energía de interacción obtenida hace pensar que se generan fuerzas intermoleculares muy intensas que rebajan la energía del complejo, facilitando que entre dentro de las hélices.

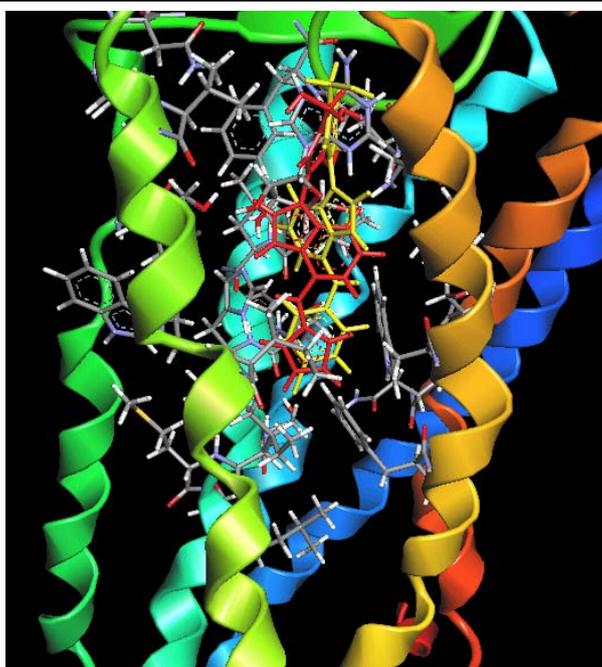
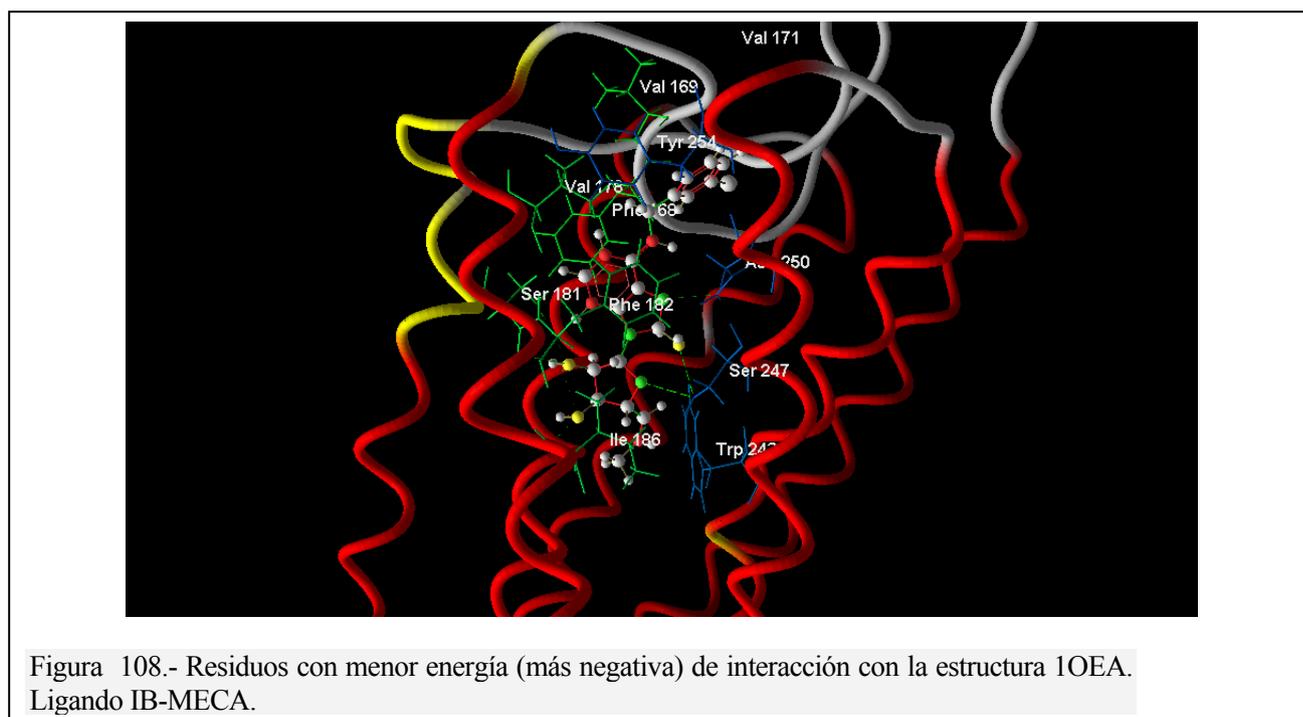


Figura 107.- Posición de los ligandos en ArgusLab “N-6-Benzyladenosine” y “N6- (4- Bromophenyl)adenosine” después de optimizar el espacio de búsqueda.

En la graficas de energía vs. Pk, (Figura 106) se observa muy poca correlación entre los valores. El único programa que muestra una ligera correlación es Molegro. Este hecho no debe sorprendernos, pues es extraño que en la bibliografía se encuentren correlaciones correctas entre Energía calculada y constante de equilibrio.

Los residuos que interaccionan con los ligandos tipo 2, son esencialmente los establecidos para la adenosina. A efectos de comparar con los resultados de los artículos tomaremos como referencia los del IB-MECA.



Los residuos marcados en verde en la Tabla 12 , son los referenciados en la bibliografía, en cambio no tenemos a LEU90, TYR152, y LEU244, que si que aparecen en la bibliografía, pero en este caso parece que no interaccionan con esta configuración (o el ligando). En este caso, los dos programas que tienen esta funcionalidad coinciden, AutoDock y Molegro.

Residuo	Energía (DockScore)	Residuo	Energía (DockScore)
TRP243	-973.215	LEU91	-131.951
VAL169	-707.995	ILE186	-112.839
SER170	-500.959	SER247	-105.508
ILE253	-448.999	MET172	-100.634
TRP185	-394.588	VAL178	-83.066
GLN167	-377.128	PHE168	-22.426
PHE182	-312.592	SER181	-10.063
VAL171	-265.528	TYR254	-6.645
ASN250	-224.958	THR94	-0.301
LEU246	-209.388	CYS251	-0.457
PHE239	-190.699	LEU264	-0.531
ILE98	-188.084	SER155	140.268
		HIS95	281.202

Tabla 12 .- Residuos interaccionantes del IB-MECA con A3AR estructura 1OEA. calculados con Molegro.

6.6 Resultados de Docking con ligandos agonistas con 1OEA, A3AR_2i36 y A3AR_2i37. En la Tabla 1 y en la Tabla 13, se presentan los valores de Energía obtenidos en una comparación de dos de los tres programas empleados con las tres estructuras. En este caso, no contemplaremos los resultados de ArgusLab, ya que hasta el momento, a pesar de su facilidad de uso, no puede informarnos detalladamente de los residuos que están interaccionando.

ENERGIAS DE INTERACCIÓN DE LIGANDOS AGONISTAS CON LAS ESTRUCTURAS CALCULADAS POR HOMOLOGÍA							
		AutoDock (kcal/mol)			Molegro (MolDockScore)		
		<i>A3AR_2I36</i> (Inactiva)	<i>A3AR_2I37</i> (Activa))	<i>IOEA</i>	<i>A3AR_2I36</i> (Inactiva)	<i>A3AR_2I37</i> (Activa))	<i>IOEA</i>
TIPO 1	Adenosine	-6,57	-5,88	-6,73	-134,77	-113,68	- 145,17
	N6-Benzyladenosine	NC	NC	NC	-130,27	-114,06	- 120,24
	N6- (4- Sulfophenyl)adenosine (SPA)	NC	NC	-7,65	-124,93	-116,75	- 144,41
	N6-(R)-Phenylisopropyladenosine (R-PIA)	NC	NC	-9,26	-131,88	-118,12	- 132,86
	5'-N-Methylcarboxamidoadenosine (MECA)	NC	NC	-6,53	-131,01	-116,69	- 134,30
TIPO 2	5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine (NECA)	-6,83	-5,81	-6,87	-148,55	-116,65	- 129,93
	5'-N- Cyclopropylcarboxamidoadenosine (NCPA)	NC	NC	-7,06	-131,91	-116,65	- 153,40
	IB-MECA	-9,46	-8,39	-10,16	-152,21	-151,02	- 164,15

Tabla 13.- Resultados de los experimentos de docking con las estructuras construidas por homología. Los valores "NC" no fueron calculados.

El valor más cercano en energía a la estructura 1OEA es entonces los casos el obtenido por A3AR_2i36, la forma inactiva. Este resultado es normal ya que 1OEA es una estructura también "inactiva". Entre las estructuras de homología "activa" y el pK se observa una ligera correlación, mientras que en la estructura inactiva los valores están más dispersos. Teóricamente al hacerse la energía más negativa tiene que disminuir el pK

En todos los casos, la energía del estado inactivo es menor que la del estado activo. Excepto en el IB-MECA en donde los valores obtenidos por Molegro se pueden considerar idénticos, puesto que entran dentro del margen de error. La causa de la disminución de la energía es debida a factores de cantidad de residuos interaccionantes, por lo que los valores absolutos no son comparables. En la figura se puede comprobar como las poses más favorecidas de la adenosina no interactúan con los mismos residuos en la forma activa y en la inactiva.

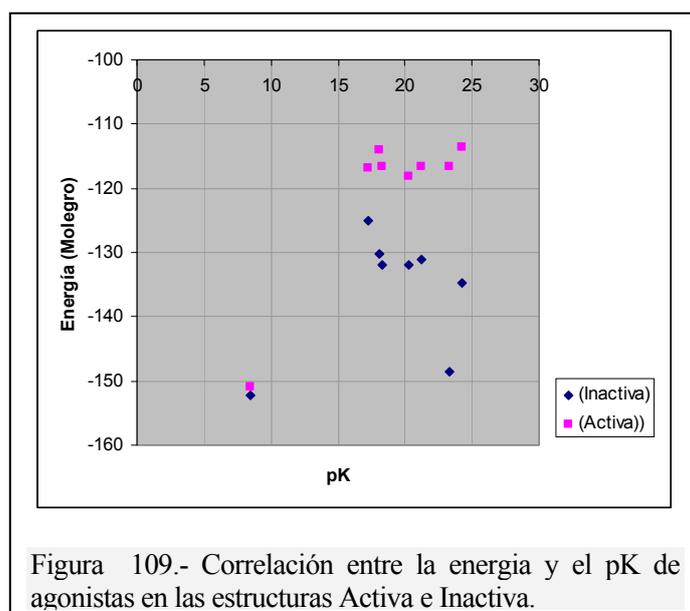


Figura 109.- Correlación entre la energía y el pK de agonistas en las estructuras Activa e Inactiva.

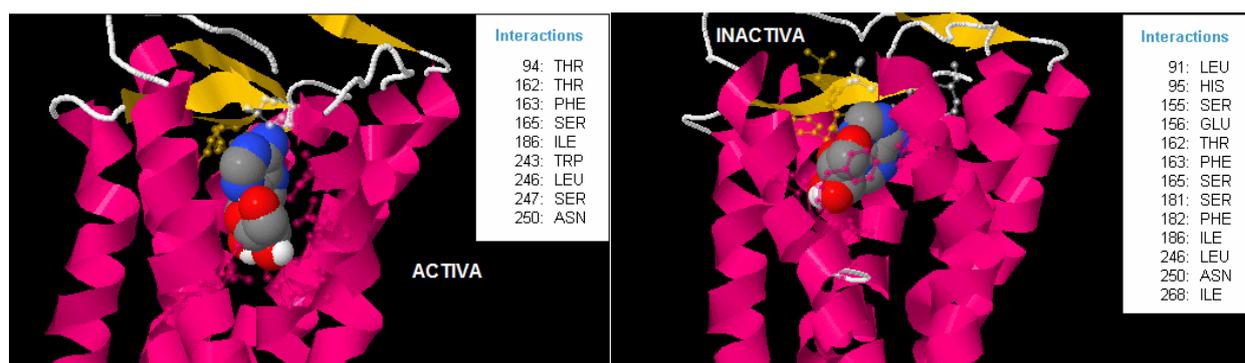


Figura 110.- Poses de la adenosina más favorecidas de la adenosina en las estructuras activa e inactiva.

Los residuos interaccionantes de IB-MECA no coinciden entre las estructuras 1OEA, A3AR_2i36 y A3AR_2i37. En la Tabla 12 se puede comprobar que la estructura A3AR_2i37 es la que tiene mayor número de residuos coincidentes con los datos bibliográficos, 7, frente a 4 de A3AR_2i36. El resto de las estructuras a excepción de la Adenosina siguen un patrón similar.

En el caso del IB-MECA, hay una apreciación que merece ser tomada en cuenta. Mientras que en la forma activa la pose más favorecida acumula el 51% de la frecuencia (cluster de posiciones con energías muy similares), la forma inactiva tiene una distribución extensa de poses, y la pose con menor energía únicamente acumula el 14% (Figura 111). Esta situación se repite para los otros ligandos, incluida la adenosina. Podemos decir que los ligandos están en una posición “metaestable”.

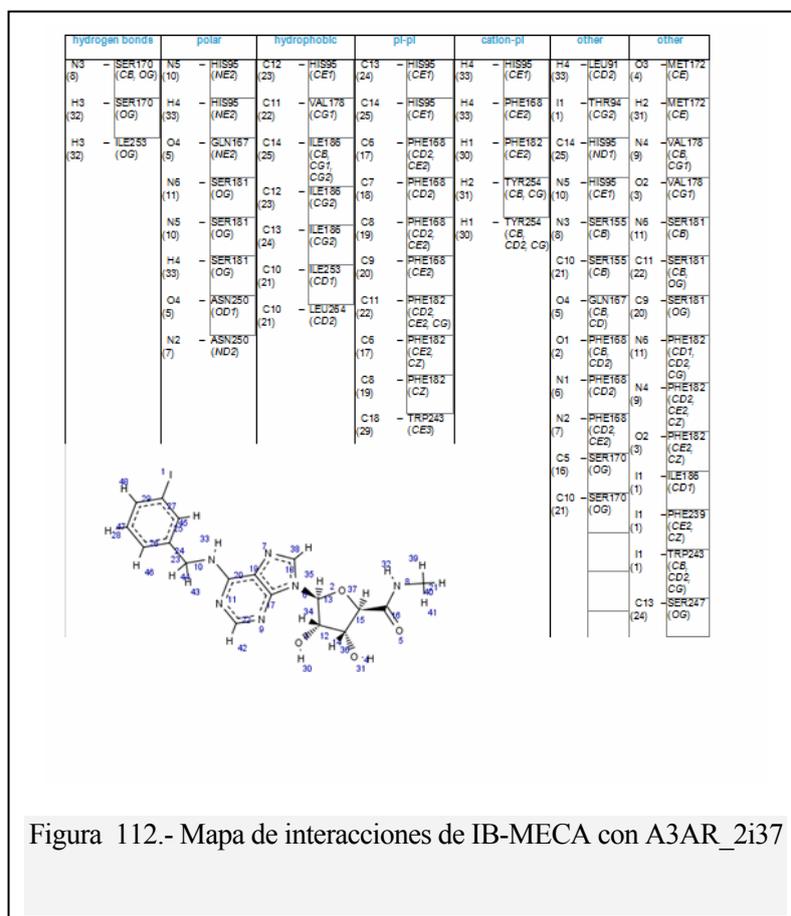
Energía de las 6 primeras poses estructura activa							
Rank	Est. Free Energy of Binding	Est. Inhibition Constant, KI	vdW + Hbond + desolv Energy	Electrostatic Energy	Total Intermolec. Energy	Frequency	Interact. Surface
1.	-8.39 kcal/mol	712.82 nM	-9.65 kcal/mol	-0.13 kcal/mol	-9.79 kcal/mol	51%	958.11
2.	-8.26 kcal/mol	878.17 nM	-9.27 kcal/mol	-0.03 kcal/mol	-9.29 kcal/mol	9%	855.83
3.	-7.95 kcal/mol	1.48 uM	-9.17 kcal/mol	-0.03 kcal/mol	-9.20 kcal/mol	6%	929.299
4.	-7.94 kcal/mol	1.52 uM	-8.68 kcal/mol	-0.08 kcal/mol	-8.75 kcal/mol	3%	827.626
5.	-7.93 kcal/mol	1.53 uM	-9.06 kcal/mol	+0.01 kcal/mol	-9.07 kcal/mol	1%	831.267
6.	-7.80 kcal/mol	1.92 uM	-8.29 kcal/mol	-0.05 kcal/mol	-8.34 kcal/mol	5%	800.247

Energía de las 6 primeras poses estructura inactiva							
Rank	Est. Free Energy of Binding	Est. Inhibition Constant, KI	vdW + Hbond + desolv Energy	Electrostatic Energy	Total Intermolec. Energy	Frequency	Interact. Surface
1.	-9.46 kcal/mol	117.22 nM	-10.56 kcal/mol	-0.15 kcal/mol	-10.71 kcal/mol	14%	966.207
2.	-8.71 kcal/mol	410.75 nM	-9.63 kcal/mol	-0.06 kcal/mol	-9.69 kcal/mol	16%	963.529
3.	-8.36 kcal/mol	748.38 nM	-9.80 kcal/mol	+0.01 kcal/mol	-9.80 kcal/mol	7%	926.498
4.	-8.25 kcal/mol	896.64 nM	-9.87 kcal/mol	-0.03 kcal/mol	-9.91 kcal/mol	2%	758.963
5.	-8.20 kcal/mol	978.19 nM	-8.89 kcal/mol	+0.06 kcal/mol	-8.84 kcal/mol	10%	883.759
6.	-8.09 kcal/mol	1.17 uM	-9.72 kcal/mol	-0.02 kcal/mol	-9.74 kcal/mol	3%	818.458

Figura 111.- Distribución de las poses de IB-MECA

RESUMEN DE RESIDUOS INTERACCIONANTES IB-MECA									
10EA			A3AR_2I36				A3AR_2I37		
Residue	ID	%	Residue	ID	%	Residue	ID	%	
TRP	243	18,1	PHE	182	18,5	VAL	178	10,8	
VAL	169	13,2	PHE	163	14,0	PHE	163	9,2	
SER	170	9,3	LEU	164	10,2	ASN	250	8,8	
ILE	253	8,4	ASN	250	10,1	PHE	182	7,8	
TRP	185	7,4	SER	165	8,7	TRP	243	6,8	
GLN	167	7,0	VAL	178	5,3	LEU	91	6,7	
PHE	182	5,8	SER	155	5,2	HIS	95	6,6	
VAL	171	4,9	CYS	166	4,0	LEU	90	4,8	
ASN	250	4,2	THR	162	3,5	SER	165	4,3	
LEU	246	3,9	LEU	153	3,2	ILE	186	4,3	
PHE	239	3,6	THR	154	3,1	THR	94	3,7	
ILE	98	3,5	TYR	254	2,7	LEU	246	3,6	
LEU	91	2,5	LEU	264	2,6	SER	181	3,6	
ILE	186	2,1	ILE	253	2,3	TYR	254	3,5	
SER	247	2,0	GLU	156	2,1	LEU	164	3,2	
MET	172	1,9	HIS	95	1,1	HIS	272	2,8	
VAL	178	1,5	TRP	185	1,0	SER	247	2,5	
PHE	168	0,4	CYS	251	0,9	ILE	268	2,4	
SER	181	0,2	SER	181	0,9	THR	162	2,4	
TYR	254	0,1	SER	247	0,4	MET	177	2,3	

Tabla 14.- Tabla resumen de resisuos interaccionantes de IB.MECA con A3AR en las diferentes estructuras. Datos extraídos de molegro. El % es la aportación del residuo a la energía total.



6.7 Resultados de Docking con ligandos antagonistas con 1OEA, A3AR_2i36 y A3AR_2i37.

En este caso, usaremos los compuestos de l artículo de (Wei et al., 2009), más la Nigulpiridina que es uno de los compuestos antagonistas característicos que se citan en la entrada de IUPHAR (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=60602>). El compuesto denominado “Nigulpiridina – Similar” está extraído de una búsqueda de similares en PubChem, es un compuesto registrado que aun no tiene nombre ().



Figura 113.- Entrada de la nigulpiridina y su similar en Pubchem.

Las estructuras de los compuestos se se dibujaron con MarvinSketch y se denominarán como: Comp1, Comp2, Comp3, Comp4 y Comp5, la numeración es equivalente a la del artículo de Wey (Los compuestos 6 y 7 no se calcularon). Las estructuras de las “Nigulpiridinas” se descargaron de Pubchem . Posteriormente, se optimizo su geometría mediante UFF con ArgusLab.

En este set de compuestos, hay dos tipos que se agrupan en Comp1, Comp2 y Comp3 , y por otra parte Comp4 y Comp5. Como se aprecia de las imágenes la nugulpiridina y su similar son también totalmente distintas de los anteriores. Cálculos de docking de los antagonistas se realizó con los mismos parámetros que los iniciales de la adenosina.

ENERGIAS DE INTERACCIÓN DE LIGANDOS ANTAGONISTAS CON LAS ESTRUCTURAS CALCULADAS						
	AutoDock (kcal/mol)			Molegro		
	2I36	2I37	1OEA	2I36	2I37	1OEA
Nigulpiridina	+10.04	-7.69	NDOCK	-186,52	-159,36	-145.17
Nigulpiridina - Similar	+7.93	-8.09	NDOCK	NC	NC	NC
Comp1	-7.89	-6.64	-7.23 (-7.48)	-165,94	-131,33	-129.76
Comp2	NC	NC	-8.12 (-7.06)	-169,91	-138,49	-111.33
Comp3	-6.73	-5.94	-7.22 (-7.50)	-152,03	-121,78	-106.51
Comp4	NC	NC	-6.32 (-7.20)	-132,69	-122,00	-78,34
Comp5	NC	NC	NDOCK	-130,06	-116,88	-81,03
EM-TBPC	-8.27	-5.75	NC	NC	NC	NC
CPPCCOEt	-6.51	-5.59	NC	NC	NC	NC

Tabla 15 .- Resultados de los cálculos de docking en antagonistas de A3AR. Lo parámetros de calculo son idénticos a los de la sección de agonistas. NC = No calculado; NDOCK= No docking. Entre paréntesis los datos del artículo de Wei

En todos los compuestos se obtuvieron valores normales de energía de interacción en las primeras pruebas, véase Tabla 15. Exceptuando la nigulpiridina y el Comp5, que en todos los casos (se repitió el cálculo tres veces) se obtuvo un valor positivo de energía con Autodock en la estructura A3AR_2i36. Debido a esto busque un compuesto similar (el denominado niguldipirina - similar) para ver si se obtenían resultados similares. Como se aprecia en la Tabla 15, los valores de energía para la niguldipirina y su similar (patentado) tienen el mismo comportamiento computacional. El Comp5 no fue posible colocarlo en el interior de la cavidad con Autodock, aunque con molegro si que entro en la cavidad, pero el valor de energía es sospechoso (en todo el proyecto el más bajo que he visto en Molegro).

Los residuos interaccionantes detectados por Autodock son los que aparecen en la tabla Tabla 16. Las interacciones con 1OEA coinciden exactamente con las indicadas en el artículo de Wei. (Excepto en el 168PHE). Los valores de energía de autodock son similares y entran dentro de lo esperado. Sin embargo la coincidencia es extrema con los resultados del artículo de Colotta, aun no siendo compuestos de la misma familia (Marcados en rojo, además de los amarillos en la Tabla 16, se pueden visualizar en la Figura 114).

Compuesto	1OEA	A3AR_2i36 (Inactiva)	A3AR_2i37 (Activa)
Niguldipiridina	NO DOCK	91LEU - 94THR - 95HIS - 98ILE - 156GLU - 162THR - 163PHE - 165SER - 178VAL - 181SER - 182PHE - 186ILE - 239PHE - 243TRP - 246LEU - 247SER - 250ASN - 253ILE - 254TYR - 264LEU - 268ILE	91LEU - 94THR - 95HIS - 98ILE - 155SER - 156GLU - 162THR - 163PHE - 165SER - 181SER - 182PHE - 186ILE - 189PRO - 190LEU - 193MET - 239PHE - 243TRP - 244LEU - 247SER - 250ASN - 264LEU - 268ILE
Niguldipiridina Similar	NO DOCK	91LEU - 94THR - 95HIS - 98ILE - 156GLU - 162THR - 163PHE - 165SER - 178VAL - 181SER - 182PHE - 186ILE - 239PHE - 243TRP - 246LEU - 247SER - 250ASN - 254TYR - 264LEU - 268ILE (METAESTABLE)	91LEU - 94THR - 95HIS - 98ILE - 141VAL - 162THR - 163PHE - 165SER - 181SER - 185TRP - 186ILE - 189PRO - 190LEU - 193MET - 239PHE - 243TRP - 244LEU - 246LEU - 247SER - 250ASN - 268ILE
Comp1	90LEU - 91LEU - 94THR - 167GLN - 168PHE - 172MET - 182PHE - 243TRP - 246LEU - 247SER - 250ASN - 253ILE - 268ILE - 271SER - 272HIS	90LEU - 91LEU - 95HIS - 162THR - 163PHE - 165SER - 178VAL - 181SER - 182PHE - 185TRP - 186ILE - 243TRP - 246LEU - 247SER - 250ASN - 271SER - 272HIS	90LEU - 91LEU - 94THR - 95HIS - 162THR - 163PHE - 165SER - 178VAL - 181SER - 182PHE - 186ILE - 243TRP - 246LEU - 247SER - 250ASN - 254TYR - 272HIS
Comp2	90LEU - 91LEU - 94THR - 167GLN - 168PHE - 172MET - 182PHE - 243TRP - 246LEU - 247SER - 250ASN - 253ILE - 254TYR - 268ILE - 271SER - 272HIS	NO CALCULADO	NO CALCULADO
Comp3	90LEU - 91LEU - 94THR - 95HIS - 167GLN - 168PHE - 182PHE - 186ILE - 243TRP - 246LEU - 247SER - 250ASN - 253ILE - 268ILE	91LEU - 95HIS - 162THR - 163PHE - 165SER - 178VAL - 181SER - 182PHE - 186ILE - 246LEU - 250ASN - 254TYR - 268ILE - 271SER - 272HIS	95HIS - 150ASN - 163PHE - 165SER - 177MET - 178VAL - 181SER - 182PHE - 186ILE - 247SER - 250ASN - 254TYR - Esta pose es metasetables
Comp4	90LEU - 91LEU - 94THR - 95HIS - 167GLN - 168PHE - 178VAL - 181SER - 182PHE - 186ILE - 243TRP - 246LEU - 247SER - 250ASN - 268ILE	NO CALCULADO	NO CALCULADO
Comp5	NO DOCK	NO CALCULADO	NO CALCULADO

Tabla 16.- Residuos de interacción con antagonistas, calculados con Autodock. En amarillo las coincidencias con el artículo de Wey

De los resultados de la Tabla 16 y de las imágenes de la Tabla 17, se aprecian con claridad 4 clusters de posiciones (representados en colores en la Tabla 16). Las poses de 1OEA son esencialmente paralelas a las hélices e interaccionan con claridad con EC2 (las bolas blancas). Son

especialmente interesantes las de Niguldipiridina, en donde se observan las interacciones de los anillos bencénicos, también paralelas a las hélices.

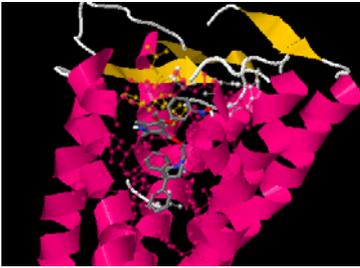
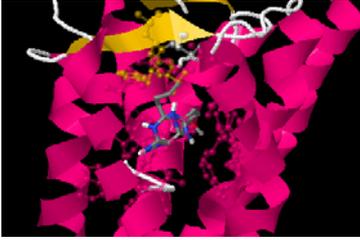
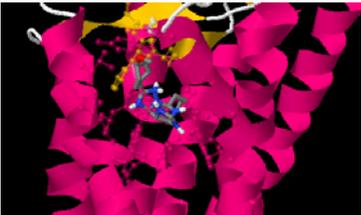
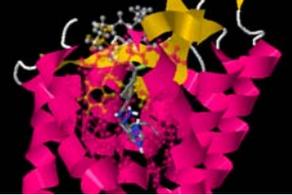
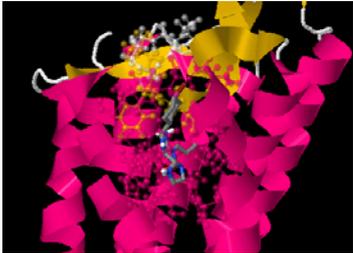
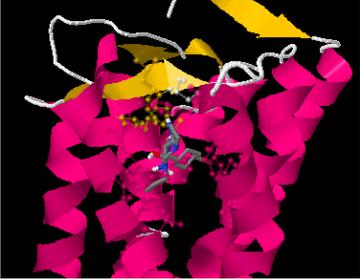
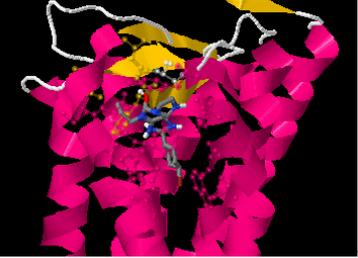
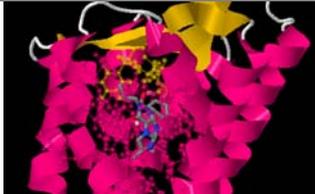
	1OEA	A3AR_2I36 (Inactiva)	A3AR_2I37 (Activa)
Niguldipiridina	NO DOCK		
Niguldipiridina Similar	NO DOCK		
Comp1			
Comp2		NO CALCULADO	NO CALCULADO
Comp3			 Esta pose es metaestable hay otra con emerja superior con mayor frecuencia
Comp4		NO CALCULADO	NO CALCULADO

Tabla 17.- Relación de “poses” de los antagonistas de A3AR.



Figura 114.- Posición de la niguldipirina en A3AR_2i37. A la izquierda vista extracelular a la derecha desde las hélices 4 y 5. La Y roja describe la conformación del articulo de Colotta. Se aprecian las interacciones con todos los aminoácidos descritos en el artículo y etiquetados en blanco en la figura.

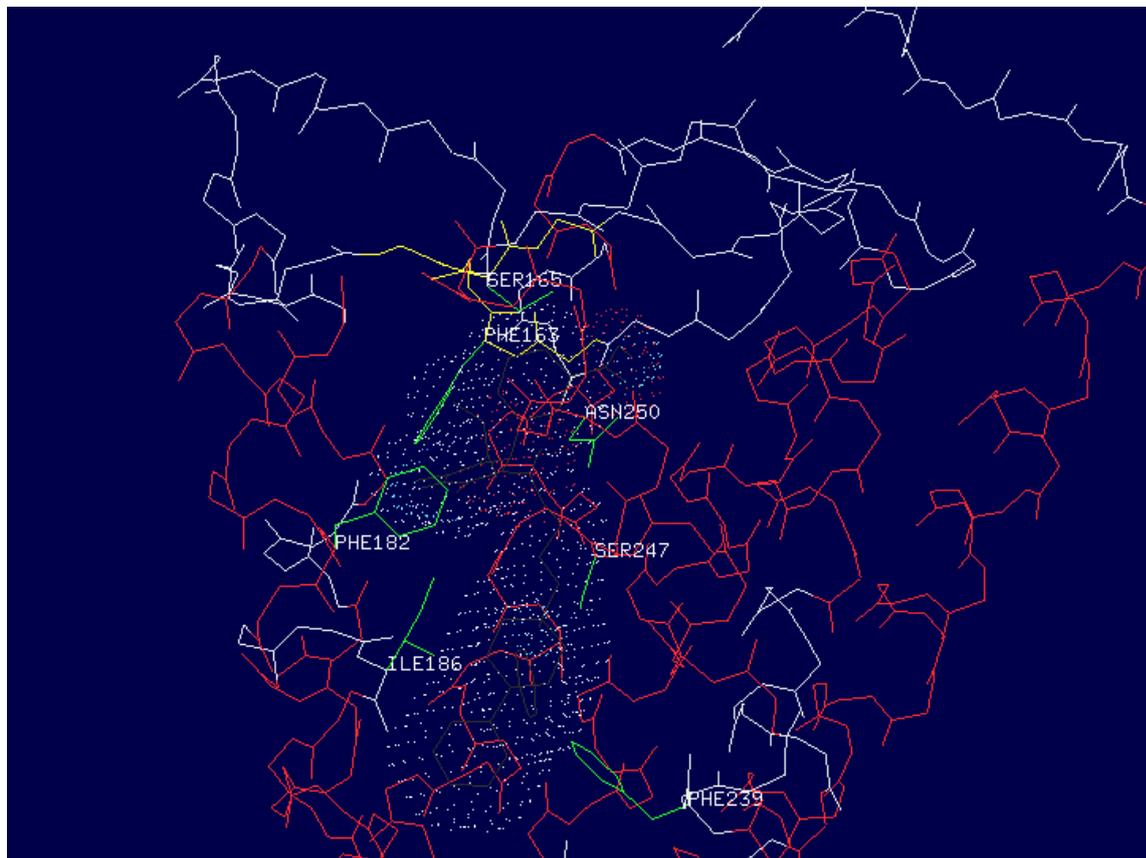


Figura 115.- Posición de la niguldipirina en A3AR_2i37. Vista desde la hélices 5 – 6 - 7. (delante la 6)

6.8 Resultados del experimento de screening de agonistas de A3AR (1OEA) con Molegro..

Con Molegro es bastante sencillo realizar un experimento de Docking una vez encontrado el sitio de unión. Se puede hacer mediante una plantilla (mucho más rápido) o seleccionando un espacio de búsqueda más reducido. La configuración empleada ha sido un gris de diámetro 13 Å, centrado en la cavidad de la (Figura 104.- Espacio de búsqueda optimizado para Molegro.), se ha configurado el programa para que devuelva únicamente una “pose” por ligando y realice una optimización de esa “pose”. El “set” de ligando es el facilitado por el artículo de Ivanov (disponible para descarga). Los resultados se encuentran en la Tabla 1.

Molegro Lig	Id	Tipo	Nombre	Ki Exp	pK	Interaction	HBond	Docking Score
Adenosine	1	1	Adenosine	0,29	24,26	-122,79	-104,78	-145,50
UNK	2	3	NECA	0,76	23,30	-890,43	-742,20	-129,93
UNK_1	3	3	NCPCA	108,00	18,34	-921,20	-451,96	-153,40
UNK_2	4	3	MECA	6,40	21,17	-127,54	-864,61	-138,38
UNK_3	5	3		23,00	19,89	-857,23	-487,26	-128,77
UNK_4	6	3		569,00	16,68	127,04	-219,38	-175,80
UNK_5	7	3		2280,00	15,29	-786,16	-348,37	-133,12
UNK_6	8	1	CPA	43,00	19,26	-721,25	-545,59	-126,86
UNK_7	9	1	N6-Benzyladenosine	140,00	18,08	551,84	-0,37	-120,24
UNK_8	10	1	R-PIA	16,30	20,23	-121,74	-825,68	-132,86
UNK_9	11	1	SPA	340,00	17,20	228,42	114,32	-144,41
UNK_10	12	1		96,00	18,46	-73,73	346,22	-125,84
UNK_11	13	1		37,00	19,41	-49,87	578,37	-121,40
UNK_12	14	1		56,00	19,00	-358,88	951,56	-129,87
UNK_13	15	1	N6- (4- Bromophenyl) adenosine	31,00	19,59	-283,65	-267,30	-116,48
UNK_14	16	1		210,00	17,68	-926,11	-825,81	-939,26
UNK_15	17	1		37,00	19,41	-117,25	657,87	-104,33
UNK_16	18	1		84,00	18,60	-751,32	108,72	-152,06
UNK_17	19	3				-353,00	914,07	-101,88
UNK_18	20	3		41,00	19,31	-152,76	-177,49	-148,31
UNK_19	21	3		64,00	18,87	-544,06	-63,49	-119,30
UNK_20	22	3		7,60	21,00	-155,85	-137,60	-104,76
UNK_21	23	1	2-CIAdo	1890,00	15,48	-350,67	-713,88	-115,09
UNK_22	24	2	HEAdo	4,70	21,48	-153,79	-0,48	-130,31
UNK_23	25	2	(R)PHPAdo	5,00	21,42	161,30	999,94	-115,91
UNK_24	26	2	(S)PHPAdo	1,40	22,69	0,65	115,28	-140,20
UNK_25	27	2		0,76	23,30	-844,59	-345,28	-138,57
UNK_26	28	2		0,97	23,06	-578,40	-103,70	-121,62
UNK_27	29	2		2,30	22,19	170,20	15,73	-106,18
UNK_28	30	4	HENECA	2,40	22,15	355,69	-105,22	-122,39
UNK_29	31	2		3,70	21,72	-362,94	-372,18	-168,34
UNK_30	32	4	(R)PHPNECA	5,50	21,32	-637,12	510,05	-161,64
UNK_31	33	4	(S)PHPNECA	0,75	23,31	-106,19	-144,94	-104,78
UNK_32	34	4	(R,S)	2,40	22,15	-143,76	-632,50	-127,20
UNK_33	35	4	(R,S)	4,10	21,61	710,30	-0,06	-148,62
UNK_34	36	4	(R,S)	1,00	23,03	-848,93	-323,32	-167,22
UNK_35	37	4	(R,S)PHPMECA	1,70	22,50	108,26	-448,63	-163,65
UNK_36	38	4				92,37	-987,12	-111,09
UNK_37	39	4				-146,87	-245,70	-145,18
UNK_38	40	1				839,77	-229,57	-139,19
UNK_39	41	1				-688,39	-236,73	-139,20
UNK_40	42	1				-934,27	-268,82	-139,26

Molegro Lig	Id	Tipo	Nombre	Ki Exp	pK	Interaction	HBond	Docking Score
UNK_41	43	1				102,25	205,53	-137,31
UNK_42	44	1				-147,90	-273,04	-145,03
UNK_43	45	1				-931,29	-274,08	-139,21
UNK_44	46	1				-957,07	-229,07	-135,05
UNK_45	47	1				-445,39	116,09	-144,49

Tabla 18.- Resultados del experimento de Docking con los ligandos del artículo de Ivanov. “Molegro Lig” es el nombre interno que se le ha dado a cada ligando en el experimento. “Tipo” es el tipo de ligando. “pK” en el $-\ln(ki \text{ exp})$. “Interacción” es el valor de la energía de interacción en unidades Arbitrarias de Molegro. “DokingScore” es el valor energético que estamos tomando en todos los experimentos como energía total. “HBond” es la energía debida a la formación de puentes de hidrógeno.

El tiempo de calculo de todo el set de ligandos resulto ser de casi 8 horas en un PC con procesador AMD “Athlon 1800Mhz” con 512 Mb de RAM. Si comparamos con el coste de cada calculo de AutoDock con DockingServer, que de aproximadamente 30 minutos (con espacio de búsqueda muy optimizado), nos hacemos una idea de porque no utilizar autodock para screening.

El grupo de ligandos de Ivanov esta dividido en cuatro tipos (Tabla 19):

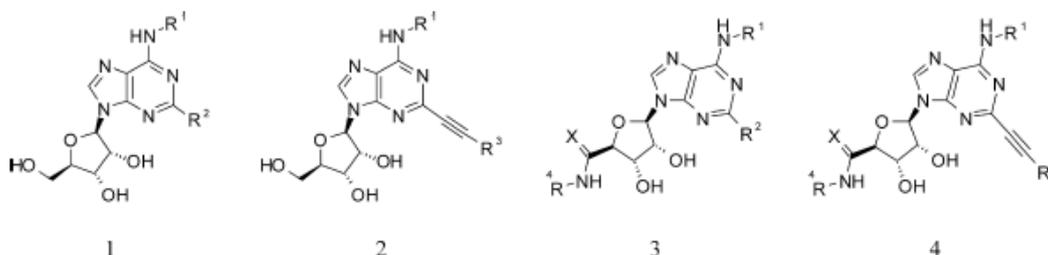


Tabla 19.- Tipos de ligandos del estudio de Ivanov.

En la tabla, se puede comprobar que el valor de la energía de interacción total (“Docking Store”) en unidades arbitrarias de Molegro para la Adenosina difiere ligeramente con respecto a los cálculos realizados anteriormente. Esta desviación es normal, e incluso en este caso resulta ser mínima, por lo que podemos tomar los parámetros del cálculo como aceptables.

El compuesto “líder”, es decir con mejor pKi experimental del grupo 1 es el marcado como “UNK_9” (SPA) con un pK experimental de 17,20. Encontramos otro compuesto con pK inferior a 18, “UNK_14”, ambos tienen una puntuación superior a 140, que parece ser el límite que identifica el carácter de agonista. Los compuestos potenciales agonistas de A3AR identificados como “UNK_42 -45” tienen también una puntuación inferior a -140, de hecho son potentes antagonistas de A2AR, y posiblemente lo sean también de A3AR. (Ligandos señalados en verde en la tabla). Si comparamos estos valores son los obtenidos anteriormente para el IB-MECA (-168), comprobamos que exactamente tiene un pK de entre 8 y 9, es decir es un extraordinario agonista de A3AR (supongo que por eso querrán sacarlo como fármaco).

En el grupo 3, hay una gran variabilidad, y no es posible establecer una referencia clara de corte para diferenciar a los agonistas potentes. Parece que el punto de corte está entre sobre los -130. (Señalados en amarillo en la tabla).

El grupo 4 presenta un patrón similar al 3, mientras que en el grupo 2, no es posible detectar un patrón, los pKs de referencia están demasiado juntos y no hay suficientes datos que permitan observar un agrupamiento.

6.9 Discusión y conclusiones.

6.9.11 Respecto a los objetivos iniciales de los casos.

Contraste de los modelos de docking facilitados por los diferentes programas.

Tanto Autodock (En su interface web de DockingServer) como Molegro coinciden totalmente. Hay que añadir que la utilidad de AutoTools que no hemos podido utilizar en estos casos, ofrece mucha más potencia informática que Molegro o DockingServer, pero no me ha sido posible utilizarla por dos razones principales: 1) La lentitud de los cálculos de Autodock rodando bajo cygwin, un solo calculo tarda 12 horas, y 2) los innumerables bugs de la interface phyton.

AutoDock en algunas ocasiones no ha sido capaz de localizar el sitio de unión (Nigulpiridina con IOEA), y en otras tras 3 o 4 horas de cálculo ofrece resultados con poses externas que hay que depurar a mano. La configuración de Molegro permite eliminar este tipo de poses y evitarse el trabajo manual.

Respecto a ArgusLab, no ofrece ninguna información acerca de las interacciones, aunque la calibración de la Energía total es bastante buena. Este programa no esta recomendado para localizar sitios de unión.

En todos los casos los aminoácidos interaccionantes han coincidido con los datos bibliográficos.

Comparación de los modelos activos e inactivos frente a IOEA.

El uso combinado de las estructuras activa e inactiva permite observar diferencias que de otra forma no serian explicables con un solo estado. Por ejemplo, as diferencias de energía entre los estados activados e inactivados de agonistas y antagonistas es cualitativamente diferente (Tabla 20).

	<i>Compuesto</i>	<i>Einactive</i>	<i>Eactivo</i>	EActivo - EInactivo
AGONISTAS	Adenosine	-134,77	-113,68	21,09
	N6-Benzyladenosine	-130,27	-114,06	16,21
	N6- (4- Sulfophenyl)adenosine (SPA)	-124,93	-116,75	8,18
	N6-(R)-Phenylisopropyladenosine (R-PIA)	-131,88	-118,12	13,76
	5'-N-Methylcarboxamidoadenosine (MECA)	-131,01	-116,69	14,32
	5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine (NECA)	-148,55	-116,65	31,90
	5'-N-Cyclopropylcarboxamidoadenosine (NCPCA)	-131,91	-116,65	15,26
	IB-MECA	-152,21	-151,02	1,19
ANTAGONISTAS	Nigulpiridina	-186,52	-159,36	27,16
	Comp1	-165,94	-131,33	34,61
	Comp2	-169,91	-138,49	31,42
	Comp3	-152,03	-121,78	30,25
	Comp4	-132,69	-122,00	10,69
	Comp5	-130,06	-116,88	13,18

Tabla 20.- Diferencias de energía del estado inactivo respecto del estado activo. Unidades arbitrarias de Molegro.

En los antagonistas 4 casos de 6, la diferencia de energía entre estados es superior a 30, mientras que en los agonistas es solo 1 de 8. Los antagonistas potentes están por encima de 30, es decir el estado inactivo de estabiliza mucho más por la acción del ligando que en el estado activo. En cambio, un agonista potente como el IB-MECA, únicamente tiene una diferencia de 1.19.

Mediante estos modelos se corrobora el mecanismo de acción de agonistas y antagonistas en A3AR: El receptor tiene una actividad basal que se balancea por la unión de un ligando no específico, es decir muchos tipos de ligandos pueden actuar sobre A3AR y no funciona como un interruptor ON/OFF (como la rodopsina), sino que funciona como un reóstato.

Evaluar la potencia del docking dirigido a estructura.

Tanto en el artículo de Ivanov como en el de Wei, el screening se realiza con farmacóforo, pero en este proyecto lo hemos hecho en base a estructura (con la energía de interacción). Los resultados son muy dispersos, y únicamente el DokingScore de Molegro es capaz de correlacionar ligeramente los datos (Figura 116). Este resultado, no es extraño, la selección del espacio de búsqueda es el elemento clave para obtener resultados aceptables. La mezcla de estados (o poses) no facilita la tarea de búsqueda, y es de momento más sencillo, y barato computacionalmente, generar un farmacóforo que buscar directamente con docking sobre la estructura.

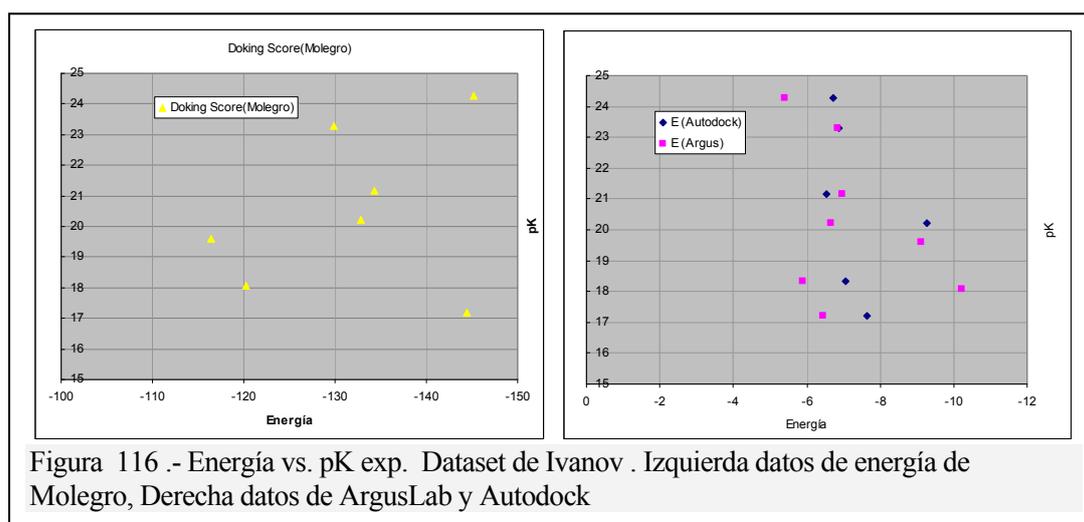


Figura 116.- Energía vs. pK exp. Dataset de Ivanov. Izquierda datos de energía de Molegro, Derecha datos de ArgusLab y Autodock

6.9.12 Consideraciones adicionales.

La evaluación de distintas metodologías de docking sobre una serie de compuestos, es un proceso extremadamente instructivo. Con la comparación, salen a relucir las ventajas y desventajas de unos y otros. Por una parte tenemos a Autodock, Arguslab (y otros), software libre, y por otra software muy funcional (normalmente empleado por las farmacéuticas) como Molegro y MOE (y otros). Las ventajas del primero es que podemos contrastar nuestros valores con las referencias bibliográficas, pero a un coste computacional muy alto, como en el caso de AutoDock, o a costa de perder información como es el caso de ArgusLab. El software comercial tiene su coste económico, pero en este caso ha demostrado ser superior, a falta de calibración.

Los modelos de activación de los GPCRs son la quitaesencia de la biología de sistemas, en cuanto seamos capaces de reproducir computacionalmente las redes de señalización celular mediante modelos de activación o regulación una parte importante del problema estará solucionada.

Los modelos de homología para los GPCRs son perfectamente válidos siempre que dispongamos de un alineamiento correcto y comprobado experimentalmente, como ha sido en este caso y no ha sido en el caso de mGLUR1. Me ha decepcionado no encontrar un modelo de TASSER para el A3AR, y me han decepcionado todos los servidores de predicción-threading de estructuras que he probado para hasta obtener una estructura válida.

La información experimental sobre mutaciones y experimentos de SDM está muy dispersa. Las bases de datos sobre reguladores son extremadamente redundantes, los artículos experimentales y computacionales tienen en muchos casos una falta evidente de rigor científico, todo esto ocasiona que a nivel académico sean inservibles, irreproducibles y muchas veces irrelevantes. Son de agradecer reviews como los de Palczewski en los que se omite lo que ya se ha dicho y van directamente al grano, a las novedades explicadas con objetividad. Para explicar que dos hélices se entrecruzan no es necesario más que dos líneas y cinco dibujos bien claros. En este caso hemos tenido suerte con la selección de artículos para los casos.

Conclusiones finales y referencias

7 Conclusiones finales

Llegado a este punto poco queda por decir que no esté en el texto o en los artículos citados. “Las Rodopsinas”, es un tema muy amplio, únicamente sobre las estructuras se podrían escribir libros, y sobre lo que llevan detrás, tomos. Me aventuraría a decir que son los compuestos más importantes del organismo después del ADN y ARN. Intervienen en todos los sistemas de comunicación celular, siendo el lenguaje de las células.

Las aplicaciones bioinformáticas son multidisciplinares, van desde la física experimental (en este caso biofísica) hasta la novedosa biología de sistemas, pesando por la informática, la química cuántica, la biología y química convencionales ... Es difícil llegar a comprender totalmente su funcionamiento en pocas semanas. Pero su naturaleza dual, “todas distintas pero todas iguales” y su aparente sencillez, las hace atractivas para el profano.

La larga introducción personalmente me ha ayudado a centrarme en el problema biológico, y recordar los conceptos “olvidados” de biología celular. Tampoco hay que olvidar que los GPCR no son las únicas proteínas de membrana.

La bibliografía sobre las rodopsinas es extensa y repetitiva, como aseveré en el texto. Y no lo ponen nada fácil al estudiante en este caso, los artículos de Palczewski son el mejor libro de texto. Hay en el mercado varios libros sobre GPCRs que he podido consultar, y no aportan nada nuevo, aparte de ser académicamente inservibles. Creo, y es opinión personal, que la mejor forma de entender las particularidades de los GPCRs es trabajando con ellas en la práctica, haciendo modelos, probándolos con docking y rastreando las bases de datos.

El análisis de GPCRDB que pedía el enunciado del proyecto lo he incluido a lo largo del texto. Esta es una base de datos muy pequeña, su tiempo de descarga es de unos minutos. Su interface web es lo de menos, su contenido, aunque escaso, es vital, “los alineamientos depurados”, la base para construir los modelos. Al análisis de las estructuras no le he dedicado mucho espacio en el texto por que me parecía que estaba copiando artículos, creo que con los casos prácticos se analiza suficiente la estructura.

Desde el punto de vista académico, nunca había aprendido tantos conceptos tan diferentes en tan corto espacio de tiempo. Incluso el “error” de novato con el mGLUR1 me supo a gloria, por la increíble facilidad que tienen las “rodopsinas” de engañar bajo su forma y funcionamiento común. Parece que estas increíbles moléculas funcionan todas mediante un mecanismo similar, no sencillo, sino similar. Por esta razón decidí dejar el ejemplo del mGLUR1 en su estado “original”, es un gazapo, pero curioso, funciona tan bien como cualquier GPCR. ¿Pueden los receptores funcionar todos bajo este mismo patrón?

El análisis de los receptores de adenosina, he decidido redactarlo como caso práctico para no repetir conceptos. En realidad no es un caso práctico, son 4 mezclados para que parezca uno. Esta forma de redacción ha sido lo más costoso ya que en ocasiones me ha sido complicado reunir los conceptos de diferentes artículos en un solo hilo. Quizás con un poco más de tiempo el texto y la explicación habría quedado más digerible.

La metodología de docking ha sido todo un reto ponerla a punto, no he trabajado con un solo programa que no diera errores inexplicables ¿?¿?¿. Quiero agradecer al Dr. Zsolt del Servicio de “DockingServer” el tiempo de cálculo gratuito que me ha dado en el servidor, sin el cual el 50% de los resultados no habrían sido posibles. Me ha impresionado Molegro por su facilidad de uso y por abstraer la complejidad de los cálculos en una interface tan agradable. Por otra parte, el resto del software empleado ha cumplido fielmente su función, incluido ArgusLab.

El futuro de la Bioinformática asociada a GPCRs lo marcarán los resultados experimentales en RX u otras técnicas de resolución de estructuras. De momento, pocas estructuras nuevas que no sea la de rodopsina en otro estado veremos en los próximos años. Los avances vendrán con la incorporación de conocimientos de otras áreas, como la cristalografía teórica, la química cuántica y sobre todo de la tecnología de micelas. El desarrollo de los conocimientos y las técnicas de docking no solo es aplicable a los receptores y proteínas, sino también a otras áreas de la biología molecular y bioinformática, como al reconocimiento de sitios de unión ARN y a las tecnologías de microarrays.

Por último, agradecer a la UOC, a todos los profesores y a los compañeros, el haber podido cursar estos estudios del postgrado de Bioinformática en un ambiente tan agradable y motivador.

Ramón Tamarit Agusti

8 Referencias

Reference List

- Bhattacharya,S., Hall,S.E. and Vaidehi,N. (2008) Agonist-induced conformational changes in bovine rhodopsin: insight into activation of G-protein-coupled receptors. *J. Mol. Biol.*, 382, 539-555.
- Colotta,V. et al. (2009) Novel potent and highly selective human A(3) adenosine receptor antagonists belonging to the 4-amido-2-arylpyrazolo[3,4-c]quinoline series: molecular docking analysis and pharmacological studies. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 401-410.
- Foord,S.M. et al. (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol. Rev.*, 57, 279-288.
- Fotiadis,D. et al. (2004) The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Lett.*, 564, 281-288.
- Fredriksson,R. et al. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.*, 63, 1256-1272.
- Gao,Z.G. et al. (2002) Structural determinants of A(3) adenosine receptor activation: nucleoside ligands at the agonist/antagonist boundary. *J. Med. Chem.*, 45, 4471-4484.
- Gessi,S. et al. (2008) The A3 adenosine receptor: An enigmatic player in cell biology. *Pharmacology & Therapeutics*, 117, 123-140.
- Gloriam,D.E. et al. (2009) Definition of the G Protein-Coupled Receptor Transmembrane Bundle Binding Pocket and Calculation of Receptor Similarities for Drug Design. *J. Med. Chem.*
- Gurevich,V.V. and Gurevich,E.V. (2008) How and why do GPCRs dimerize? *Trends Pharmacol. Sci.*, 29, 234-240.
- Harmar,A.J. et al. (2009) IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic Acids Res.*, 37, D680-D685.
- Hasko,G. et al. (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7, 759-770.
- Horn,F. et al. (2003) GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.*, 31, 294-297.
- Isin,B. et al. (2006) Predisposition of the dark state of rhodopsin to functional changes in structure. *Proteins*, 65, 970-983.
- Ivanov,A.A., Palyulin,V.A. and Zefirov,N.S. (2007) Computer aided comparative analysis of the binding modes of the adenosine receptor agonists for all known subtypes of adenosine receptors. *J. Mol. Graph. Model.*, 25, 740-754.

- Joy,S. et al. (2006) Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of GOLD, a commercial package and ArgusLab, a licensable freeware. *In Silico. Biol.*, 6, 601-605.
- Kobilka,B.K. and Deupi,X. (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 28, 397-406.
- Lee,A.G. (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1666, 62-87.
- Legewie,S. et al. (2008) Recurrent design patterns in the feedback regulation of the mammalian signalling network. *Mol Syst Biol*, 4.
- Malherbe,P. et al. (2003) Mutational analysis and molecular modeling of the allosteric binding site of a novel, selective, noncompetitive antagonist of the metabotropic glutamate 1 receptor. *J. Biol. Chem.*, 278, 8340-8347.
- Martinelli,A. and Tuccinardi,T. (2008) Molecular modeling of adenosine receptors: new results and trends. *Med. Res. Rev.*, 28, 247-277.
- Menon,S.T., Han,M. and Sakmar,T.P. (2001) Rhodopsin: structural basis of molecular physiology. *Physiol Rev.*, 81, 1659-1688.
- Milligan,G. (2007) G protein-coupled receptor dimerisation: molecular basis and relevance to function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768, 825-835.
- Milligan,G. (2008) A day in the life of a G protein-coupled receptor: the contribution to function of G protein-coupled receptor dimerization. *Br. J. Pharmacol.*, 153 Suppl 1, S216-S229.
- Muller,D.J., Wu,N. and Palczewski,K. (2008) Vertebrate membrane proteins: structure, function, and insights from biophysical approaches. *Pharmacol. Rev.*, 60, 43-78.
- Mustafi,D. and Palczewski,K. (2009) Topology of class A G protein-coupled receptors: insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors. *Mol. Pharmacol.*, 75, 1-12.
- N.Barton and F.E.Blaney,S.G.B.T.a.I.W. (2007) Seven Transmembrane G Protein-Coupled Receptors: Insights for Drug Design from Structure and Modeling. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, pp. 669-701.
- Palczewski,K. (2006) G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 743-767.
- Patny,A., Desai,P.V. and Avery,M.A. (2006) Homology modeling of G-protein-coupled receptors and implications in drug design. *Curr. Med. Chem.*, 13, 1667-1691.
- Saxena,A.K. et al. (2008) Internet resources in GPCR modelling. *SAR QSAR. Environ. Res.*, 19, 11-25.
- Scheerer,P. et al. (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, 455, 497-502.
- Schioth,H.B. and Fredriksson,R. (2005) The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen. Comp Endocrinol.*, 142, 94-101.

- Schioth,H.B., Nordstrom,K.J. and Fredriksson,R. (2007) Mining the gene repertoire and ESTs for G protein-coupled receptors with evolutionary perspective. *Acta Physiol (Oxf)*, 190, 21-31.
- Skach,W.R. (2009) Cellular mechanisms of membrane protein folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16, 606-612.
- Suda,K. et al. (2004) The supramolecular structure of the GPCR rhodopsin in solution and native disc membranes. *Mol. Membr. Biol.*, 21, 435-446.
- Teller,D.C., Stenkamp,R.E. and Palczewski,K. (2003) Evolutionary analysis of rhodopsin and cone pigments: connecting the three-dimensional structure with spectral tuning and signal transfer. *FEBS Lett.*, 555, 151-159.
- Tobias,N. et al. (2006) Allosteric Modulation of Family 3 GPCRs. *QSAR & Combinatorial Science*, 25, 134-146.
- Tomasello,G. et al. (2009) Electrostatic control of the photoisomerization efficiency and optical properties in visual pigments: on the role of counterion quenching. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 5172-5186.
- Villoutreix,B.O. et al. (2007) Free resources to assist structure-based virtual ligand screening experiments. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 8, 381-411.
- von,H.G. (2007) The membrane protein universe: what's out there and why bother? *J. Intern. Med.*, 261, 543-557.
- Wei,J. et al. (2009) Molecular docking study of A3 adenosine receptor antagonists and pharmacophore-based drug design. *Neurochem. Int.*, In Press, Corrected Proof.
- Werner,K. et al. (2007) Combined solid state and solution NMR studies of alpha,epsilon-15N labeled bovine rhodopsin. *J. Biomol. NMR*, 37, 303-312.
- Wess,J. et al. (2008) Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation. *Trends Pharmacol. Sci.*, 29, 616-625.
- Yanamala,N., Tirupula,K.C. and Klein-Seetharaman,J. (2008) Preferential binding of allosteric modulators to active and inactive conformational states of metabotropic glutamate receptors. *BMC. Bioinformatics.*, 9 Suppl 1, S16.