



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DINÁMICA MOLECULAR DE RECEPTORES ACOPLADOS A
PROTEÍNAS G (GPCR) EN DIFERENTES ESTADOS DEL
MECANISMO DE ACTIVACIÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

KARLA GONZÁLEZ PONCE

Ciudad de México, 2019.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
VOCAL	Profesora: DULCE MARÍA GÓMEZ ANDRADE
SECRETARIO	Profesora: KARINA MARTÍNEZ MAYORGA
1er. SUPLENTE	Profesora: ADELINA ESCAMILLA LOEZA
2° SUPLENTE	Profesor: FÉLIX MORALES FLORES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE QUÍMICA, U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. KARINA MARTÍNEZ MAYORGA

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. ABRAHAM MADARIAGA MAZÓN

SUSTENTANTE:

KARLA GONZÁLEZ PONCE

Agradecimientos

A la Facultad de Química y al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo brindado, así como a todos los profesores involucrados en mi formación académica.

A mis asesores, la Dra. Karina Martínez Mayorga y al Dr. Abraham Madariaga Mazón por integrarme a su excelente grupo de trabajo. Al Dr. Michael F. Brown por las discusiones del tema.

A los integrantes del grupo QUIBIC por la convivencia.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada mediante el proyecto PAPIIT IN210518 y a Laboratorios Biosen.

A VMD/NAMD, GROMACS, Pymol, OSIRIS Data Warrior, CHARMM-GUI, Chemaxon y Schrodinger por proporcionar licencias académicas o de acceso libre.

Partes de este trabajo fueron presentadas en los siguientes foros:

Gonzalez-Ponce, K., Madariaga-Mazon, A. y Martinez-Mayorga, K. "Dinámica molecular de proteínas membranales en diferentes estados del ciclo de activación" Simposio Interno, Instituto de Química, UNAM, 13 – 15 junio, 2018.

Gonzalez-Ponce, K., Madariaga-Mazon, A. y Martinez-Mayorga, K. "Flexibility at different stages of mechanism of activation of the GPCR-prototype agrees with local motions explored by molecular dynamics simulations" 257th ACS National Meeting, Orlando, Florida, USA, 31 marzo – 4 abril, 2019.

Se participó en el siguiente capítulo de libro:

Gomez-Jimenez, G.; Gonzalez-Ponce, K.; Castillo-Pazos, D. J.; Madariaga-Mazon, A.; Barroso-Flores, J.; Cortes-Guzman, F.; Martinez-Mayorga, K. "The OECD Principles for (Q)SAR Models in the Context of Knowledge Discovery on Databases (KDD)" en *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Elsevier, 2018, 113, 85-115.

Índice

Abreviaturas	6
1. Introducción.....	7
2. Hipótesis y Objetivo.	9
2.1 Hipótesis.....	9
2.2 Objetivo	9
3. Marco teórico.....	10
3.1 Receptores acoplados a proteínas G.....	10
3.2 Rodopsina.....	12
3.2.1 Secuencia y regiones conservadas.....	12
3.2.2 Mecanismo de activación.....	16
3.3 Simulaciones de Dinámica Molecular.....	19
4. Metodología.....	24
5. Resultados y discusión.....	28
6. Conclusiones.....	39
7. Perspectivas.....	41
8. Referencias	44

Abreviaturas

GPCRs	<i>G Protein-Coupled Receptors</i> (receptores acoplados a proteínas G)
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i> (raíz cuadrada de la desviación media al cuadrado).
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i> (raíz cuadrada de la fluctuación media al cuadrado)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
OPM	<i>Orientations of Proteins in Membranes</i>
KDD	<i>Knowledge Discovery on Databases</i>
SDPC	<i>1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-phosphatidylcholine</i>
SDPE	<i>1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-phosphatidylethanolamine</i>

1. Introducción.

Los receptores acoplados a proteínas G o GPCRs, por sus siglas en inglés, conforman una superfamilia de proteínas encargadas de funciones biológicas, incluyendo la percepción sensorial mediante los receptores olfativos y gustativos (que se estiman son ~500 tipos diferentes en mamíferos) y las proteínas fotosensibles ubicadas en la retina del ojo, conocidas como rodopsinas. La proteína prototipo de esta superfamilia, y la más estudiada, es la rodopsina bovina.

La estructura tridimensional de la rodopsina fue la primera de esta superfamilia en ser determinada por difracción de rayos-X de alta resolución (Palczewski, K. *et al.*, 2000). Además, los GPCRs son la clase más importante de diana terapéutica: aproximadamente 40% de los fármacos aprobados tienen como principal mecanismo de acción la interacción con un GPCR (Ho *et al.*, 2017; Madariaga-Mazón *et al.*, 2017). Estas proteínas de membrana intervienen en la comunicación de la célula con el entorno externo. Algunos de los estímulos externos que modulan estos receptores son compuestos aromatizantes, saborizantes, la luz, toxinas, y fármacos, así como moléculas endógenas como las hormonas, los neurotransmisores, etc.

Comprender los cambios conformacionales que se generan en estos receptores durante su activación es significativo, debido a su papel en procesos sensoriales, en la comunicación celular y en el diseño de moléculas bioactivas. Para contribuir en este campo, las simulaciones de dinámica molecular son particularmente útiles, al permitir abordar aspectos clave de la modulación de sistemas biológicos, tales como la energía libre de unión (afinidad), cambios conformacionales de las proteínas inducidos por ligandos, cinética de unión a ligandos, etc. La relevancia de las simulaciones de dinámica molecular recae en la posibilidad de explorar los cambios conformacionales de los sistemas bajo estudio, con resolución a nivel atómico. Por su parte, el creciente avance en supercómputo ha hecho posible generar simulaciones de dinámica molecular a escalas de tiempo sin precedentes (Grossfield *et al.*, 2006; Martínez-Mayorga *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2007).

Recientemente, se reportó un estudio experimental mostrando una diferencia significativa en la dinámica de la apoproteína (opsina) y la rodopsina en el estado inactivo (Shrestha, U. R. *et al.*, 2016). Dicho estudio sugiere que los átomos de hidrógeno de la rodopsina se relajan en un intervalo de tiempo amplio (en la escala de picosegundos hasta nanosegundos), haciendo evidente que las diferencias de ambos sistemas son significativas y que podrían ser observadas en una simulación computacional a nivel molecular. Además se ha determinado experimentalmente que existen diferencias entre estructuras intermediarias del ciclo de activación de ésta proteína, como las observadas por los grupos de Kimata (Kimata, N., Reeves, P. J. & Smith, S. O., 2015) y Leioatts (Leioatts, N. *et al.*, 2014) El objetivo de este proyecto fue identificar a nivel atómico, mediante estudios de dinámica molecular, las diferencias en la flexibilidad de la apoproteína (opsina) y de la proteína rodopsina en el estado inactivo, es decir unida al agonista inverso 11-*cis*-retinal.

2. Hipótesis y Objetivo.

2.1 Hipótesis

La rodopsina (estado inactivo) presenta mayor flexibilidad que la opsina (estado cercano al activo), debido a fluctuaciones locales a nivel atómico, que pueden ser observadas en simulaciones de dinámica molecular de todos los átomos.

2.2 Objetivo

Realizar simulaciones de dinámica molecular de todos los átomos de la proteína rodopsina en el estado inactivo (unida al 11-*cis*-retinal) y de la opsina (ausencia del ligando) la cual representa una conformación cercana a la activada, construyendo para ello ambos sistemas en un ambiente lipídico y osmótico celular.

3. Marco teórico

3.1 Receptores acoplados a proteínas G.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son proteínas membranales que intervienen en la comunicación celular respondiendo a moléculas endógenas (e. g. hormonas, neurotransmisores) y exógenas (e. g. toxinas, compuestos psicoactivos, sabores y aromas, fármacos). Estos ligandos pueden ser agonistas: aquellos que se unen al receptor y generan una respuesta en la célula; antagonistas: aquellos que bloquean la acción del agonista; o agonistas inversos: los que generan una respuesta contraria a la ocasionada por el agonista. Estudiar los GPCRs a nivel molecular no es trivial, debido al tamaño del sistema biomolecular y a la escala de tiempo en la que se llevan a cabo los cambios conformacionales que llevan a su activación. La interacción de estas proteínas con moléculas que están en el exterior de la célula provoca cambios conformacionales que inducen a la interacción con proteínas que se encuentran en el interior de la célula (Gonzales, P., 2012).

La topología de los GPCRs es común y se caracteriza por la presencia de un extremo amino extracelular, un extremo carboxilo intracelular y siete hélices transmembrana (TM1-TM7) conectadas por lazos. Las secuencias aminoacídicas de los GPCRs comparten un 60% de identidad, siendo las regiones transmembranales las zonas más conservadas (73-76% de homología) y las extracelulares las de mayor variabilidad (34-40 % de identidad; Vicente, A., 2012).

El proceso de señalización de GPCRs a proteínas G inicia con su activación debida a ligandos que se introducen desde el lado extracelular del receptor. Luego, el receptor se une a la proteína G mediante su extremo carboxilo (intracelular). Una vez que la proteína G está activada, la subunidad α intercambia guanosín difosfato (GDP) por guanosín trifosfato (GTP) y se separa de las

subunidades β y γ . Las subunidades pueden interactuar con otras proteínas, lo que desencadena una vía de señalización que conduce a una respuesta.

Finalmente, la subunidad α hidroliza el GTP a GDP y el agonista se separa del GPCR, con la subsecuente inactivación de la proteína G. Posteriormente, se regenera el complejo proteico formado por las subunidades α , β y γ de la proteína G. La señalización celular que involucra GPCRs es cíclica y puede repetirse una y otra vez en respuesta a la unión con el ligando, como lo muestra la Figura 1.

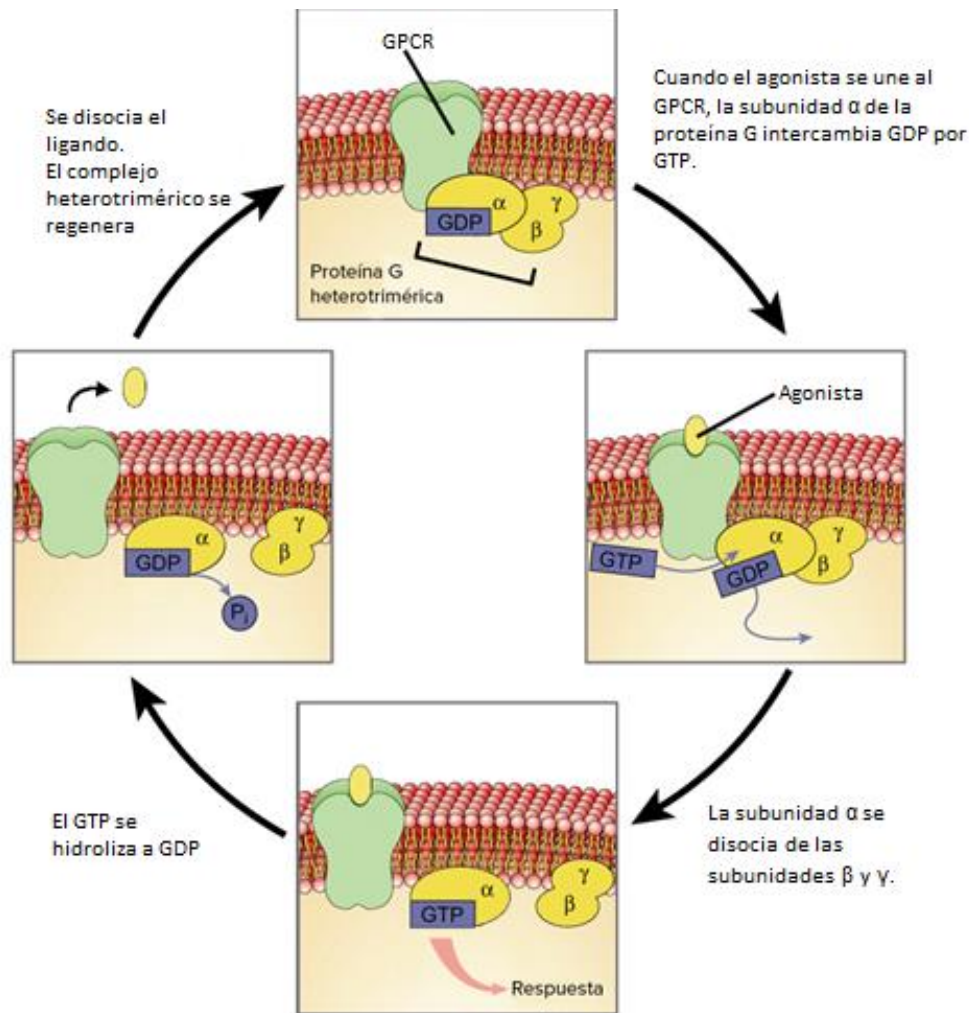


Figura 1. Ciclo de activación/desactivación de proteínas G. La proteína G permanecerá en estado activo siempre y cuando la subunidad α esté unida a GTP. Cuando el agonista se disocia del GPCR, la subunidad α hidroliza GTP a GDP y se regenera el estado inactivo de la proteína G heterotrimérica. Tomado de Rye, C. *et al.*, (2013).

La superfamilia de GPCRs comprende alrededor de 800 miembros, clasificados en cinco grandes familias filogenéticas: Glutamato, Rodopsina, Adhesión, *Frizzled/taste2* y Secretina; conocidas también con el acrónimo G.R.A.F.S. Esta división, introducida originalmente por Schiöth y Fredriksson (Schiöth, H. B. & Fredriksson, R., 2005) permite además agrupar los receptores pertenecientes a cada uno de los grupos en diversas subfamilias, de los cuales, la clase A (también llamada tipo rodopsina) es la más amplia y mejor estudiada hasta el momento (Perpiñá Tordera, M., 2017).

3.2 Rodopsina

La comprensión de la estructura de los GPCR se basa en gran medida en el estudio de la rodopsina. Esta abundancia natural de proteína la ha hecho el prototipo de esta superfamilia y ha permitido la obtención de su estructura en el estado inactivo y activo, mediante difracción de rayos X, además de una amplia caracterización empleando métodos analíticos y biofísicos. Además, la rodopsina es un GPCR notablemente estable, respecto a otros miembros de esta superfamilia, que conserva la función en condiciones en que se desnaturalizan muchos otros GPCRs. (Kobilka, B. K., 2007)

3.2.1 Secuencia y regiones conservadas

La rodopsina es una proteína de membrana cuya cadena polipeptídica está formada por 348 aminoácidos cuya estructura primaria se muestra en la Figura 2.

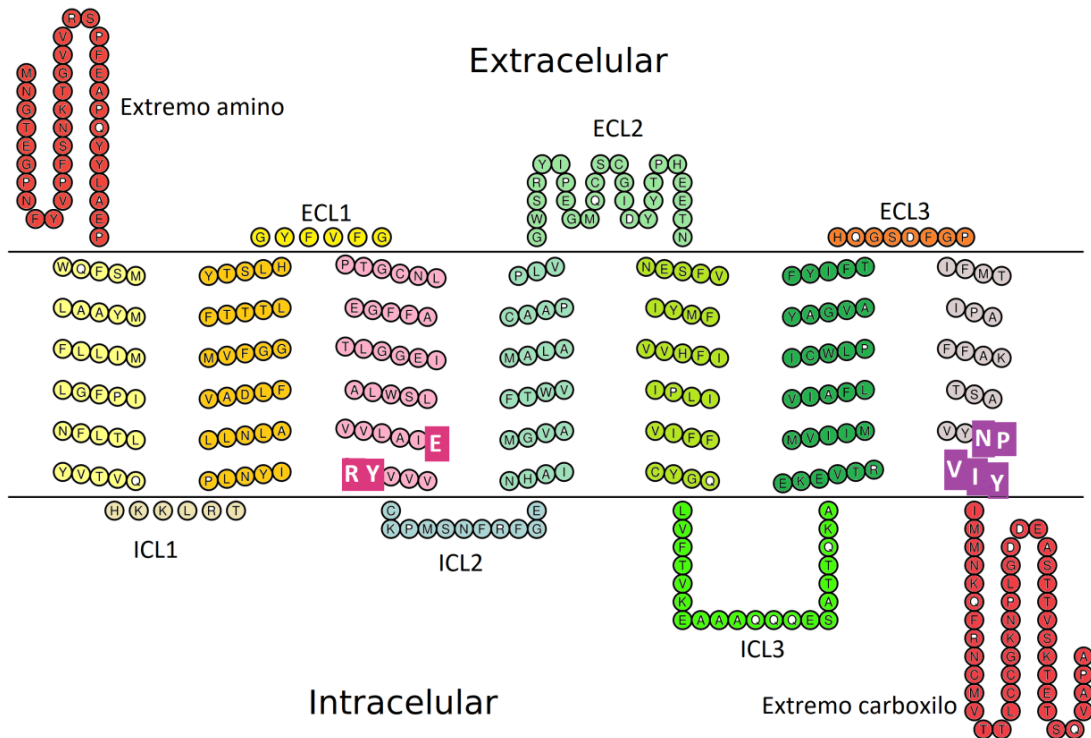


Figura 2. Diagrama de la estructura primaria de la rodopsina y regiones conservadas. En color magenta la región ERY y en violeta la región NPxxY. Esta figura se generó con el recurso en línea TOPO2 (Johns, S. J., n.d.) con la información de Tabla 1.

Los movimientos globales de hélices durante la activación de los GPCRs van acompañados de un conjunto común de "microcambios" locales en la parte intracelular de los GPCRs. Los cuales son caracterizados por cambios en los rotámeros de las cadenas laterales de los aminoácidos altamente conservados (mostrados en la Figura 2), que estabilizan los movimientos globales de hélices y ayudan a preparar el lado intracelular de GPCR para la interacción con la proteína G.

De la secuencia conservada ERY en la hélice 3, uno de los aminoácidos es Arg^{3.50}, el cual forma un puente salino con la cadena lateral ácida vecina Asp/(Glu)^{3.49} y también puede formar un puente salino con Asp^{6.30}, conocido como "puerta iónica", que conecta los extremos intracelulares de las hélices 3 y 6. Este

punto salino se observó por primera vez en las estructuras de la rodopsina bovina en el estado inactivo, obtenidas por difracción de rayos-X.

El aminoácido Tyr306^{7.53} se encuentra en la secuencia conservada NPxxY, en la hélice 7, y funge como un microinterruptor de activación en los GPCRs (Katritch, V., Cherezov, V. & Stevens, R. C., 2013). En las estructuras de GPCRs en el estado inactivo, la cadena lateral de este aminoácido está orientada hacia las hélices 1, 2 u 8. Por el contrario, en las estructuras de GPCRs en el estado activo, la cadena lateral de Tyr^{7.53} se dirige hacia el centro del receptor, formando interacciones con las hélices 3 y 6. Estas interacciones se muestran en la Figura 3.

Tabla 1. Intervalo de residuos que conforman las diferentes regiones del receptor (Palczewski, K. *et al.*, 2000)

Residuos	Región	Longitud (No. de aminoácidos)
1-34	Extremo amino extracelular	34
35-64	Hélice 1(TM1)	30
65-70	Lazo citoplásmico 1 (ICL1)	6
71-100	TM2	30
101-106	Lazo extracelular 1 (ECL1)	6
107-139	TM 3	33
140-150	ICL 2	11
151-173	TM 4	23
174-199	ECL 2	26
200-225	TM 5	26
226-246	ICL 3	21
247-277	TM 6	31
278-285	ECL3	8
286-306	TM 7	21
307-348	Extremo carboxilo citoplásmico	42

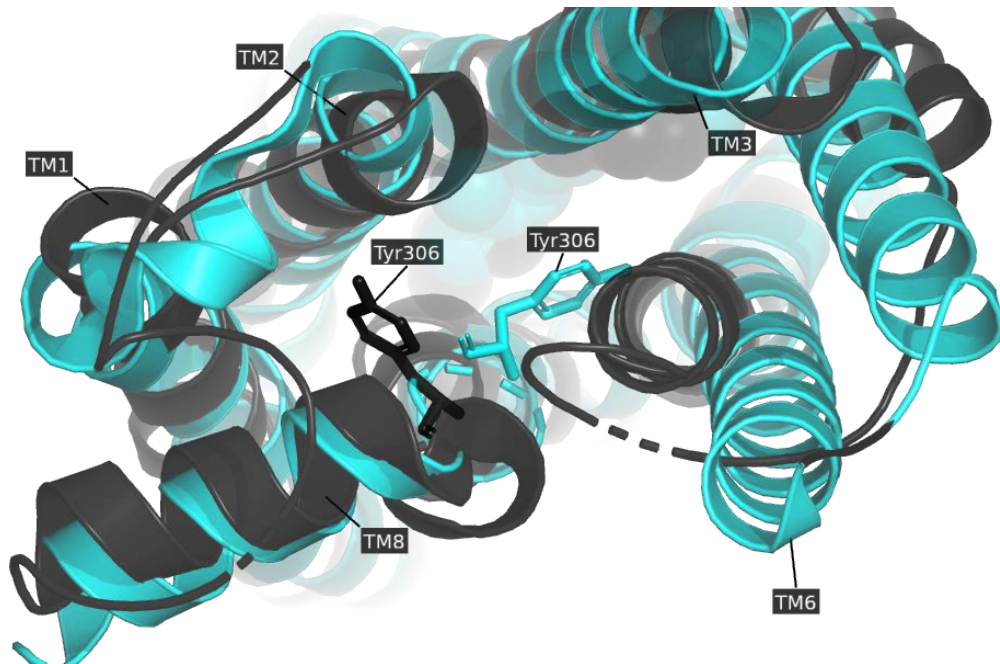


Figura 3. Orientación del aminoácido Tyr306. En color negro se muestra la estructura de la proteína rodopsina (estado inactivo con PDBID: 1F88), el aminoácido Tyr306 está orientado hacia las hélices 1, 2 y 8. En color azul se muestra la estructura de la metarodopsina II (estado activo, PDBID: 3PXO) el aminoácido Tyr306 está orientado hacia TM3 y TM6.

La unión de la apoproteína, llamada opsina, con una molécula cromófora derivada de la vitamina A (11-*cis*-retinal) mediante un enlace covalente (base de Schiff protonada o PSB) con la Lys296 o K^{7.43} de acuerdo con el sistema de Ballesteros y Weinstein (Ballesteros, J. A. & Weinstein, H., 1995) de la apoproteína forma la rodopsina, como lo muestra la Figura 4.

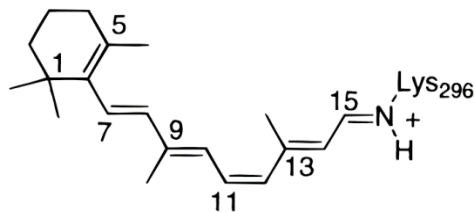


Figura 4. Base de Schiff formada entre el aminoácido 296 de la proteína rodopsina y el 11-*cis*-retinal. (Latorraca, N. R., Venkatakrisnan, A. J. & Dror, R. O., 2017)

La molécula de retinal interactúa además con otros aminoácidos, como se muestra en la Figura 5.

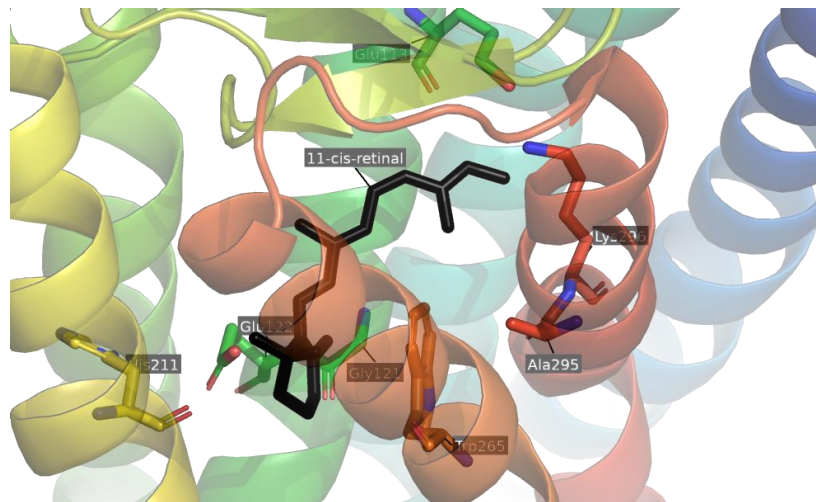


Figura 5. Interacción del agonista inverso 11-cis-retinal con aminoácidos del sitio ortostérico de la rodopsina (estado inactivo).

Diferentes interacciones moleculares bloquean al receptor en la conformación inactiva, las cuales incluyen el enlace del 11-*cis*-retinal con la rodopsina, la interacción electrostática Glu113-PSB, el enlace de hidrogeno que se forma entre Glu122 e His211 y las interacciones de van der Waals presentes entre Trp265 y la cadena de polieno del 11-*cis*-retinal. (Pope, A. *et al.*, 2014)

3.2.2 Mecanismo de activación

En los seres humanos, esta proteína se encuentra en los bastones de la retina y es el punto de partida en el proceso de visión en bajas condiciones de luz (visión escotópica).

Cuando la luz incide sobre la retina llega primero a las capas más externas de esta, pero no es hasta llegar a la capa más alejada, la de las células fotorreceptores, cuando inicia las reacciones bioquímicas que comprenden el

proceso de fototransducción visual. Cuando la rodopsina se encuentra en la oscuridad (estado inactivo), su cromóforo es capaz de absorber un fotón (Valle Mendoza, L. J. del *et al.*, 2002). La absorción de un fotón provoca la isomerización del 11-*cis*-retinal a la forma *trans* y esto induce un cambio conformacional transitorio en la proteína caracterizado por una serie de fotointermediarios que absorben a longitudes de onda características en espectro de UV-Vis, mostrados en la Figura 6. El último paso en el ciclo visual de la rodopsina consiste en la liberación del *trans*-retinal de la proteína, tras la ruptura del enlace covalente con Lys296; dando lugar a la opsina. Este ciclo es conocido como proceso de fotoactivación de la rodopsina y se muestra en la Figura 6.

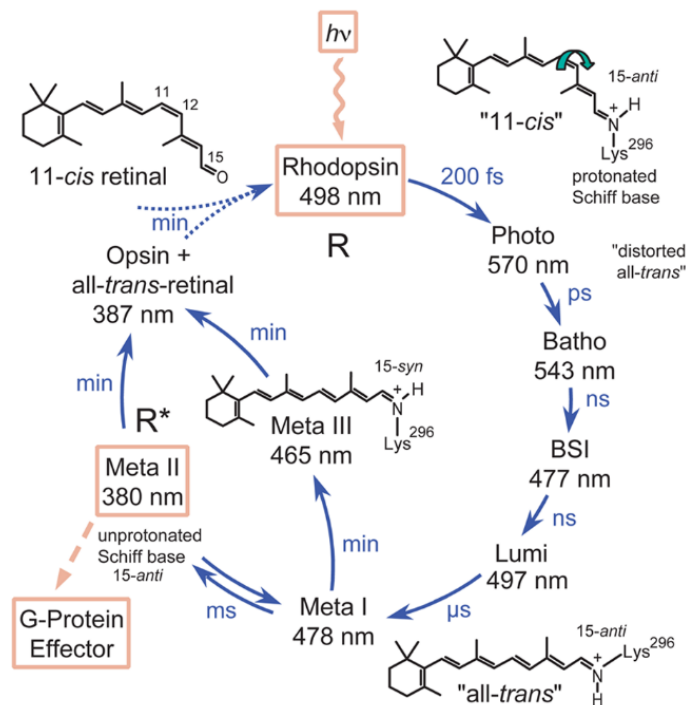


Figura 6. Proceso de fotoactivación de la rodopsina (estado inactivo).

Tomado de Ernst, O. P. *et al.*, (2014). Cada uno de los intermediarios involucrados en este proceso: fotorodopsina (Photo), batorodopsina (Batho), intermediario *blue-shifted* (BSI) lumirodopsina (Lumi) y metarodopsinas (Meta I y Meta II); se han caracterizado al absorber en diferentes regiones del espectro UV-Vis. Los primeros cuatro intermediarios tienen un tiempo de vida corto. Mientras que, el estado Meta I se encuentra en equilibrio con el intermediario que interactúa con la proteína G (el agonista metarodopsina II).

Se han identificado siete intermediarios cromofóricos, los cuales absorben a diferentes longitudes de onda en el UV-Vis y que se generan en amplia escala de tiempo. Mientras que los primeros intermediarios se generan en tiempos muy cortos (del orden de los femto y pico segundos), los intermediarios finales del ciclo se generan en minutos. Al incidir la luz sobre la rodopsina, ocurre la fotoisomerización del retinal (cambio de 11-*cis* a *trans*) dentro de los primeros 200 fs, como se representa en la Figura 7 (Shrestha, U. R. *et al.*, 2016).

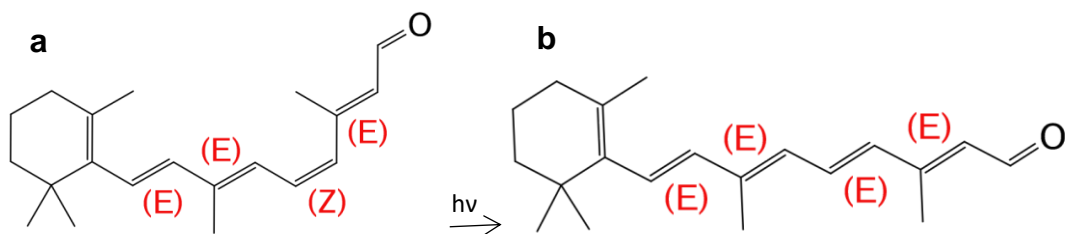


Figura 7. Fotoisomerización del retinal. a) 11-*cis*-retinal b) *trans*-retinal

El cromóforo 11-*cis*-retinal bloquea a la rodopsina en el estado inactivo y actúa como un agonista inverso al evitar la interacción con su proteína G afín, la transducina. Al estar el agonista en su forma *trans* permite que la rodopsina interactúe con la proteína heterotrimérica afín, una red extendida de puentes de hidrógeno conecta el sitio de unión del retinal al sitio de unión a la proteína G a través de aminoácidos conservados (Sugihara, M., Suwa, M. & Bondar, A.-N., 2014), con el consiguiente intercambio de GTP por GDP. Esto dispara una cascada de reacciones enzimáticas que producen la hiperpolarización de la membrana de las células foto-receptoras, generando eventualmente un impulso nervioso que se transmite al cerebro.

3.3 Simulaciones de Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular de todos los átomos permiten identificar el movimiento de los átomos de un sistema. Cuando se contrastan con observaciones experimentales, permiten inferir detalles mecánicos a nivel atómico (Lindahl, E. R., 2008). Estas simulaciones se fundamentan en la ecuación de movimiento de Newton (*Ec. 1*) para los átomos que interactúan en el sistema:

$$F = ma = m \frac{dv}{dt} = m \frac{d^2r}{dt^2} \dots Ec. (1)$$

donde F es la fuerza ejercida sobre la partícula, m es su masa, a es su aceleración, v es su velocidad, t es el tiempo y r es su posición.

Como se describe en la *Ec. 2* la fuerza también se puede expresar como el gradiente de la energía potencial:

$$F = \nabla V = - \frac{dV}{dr} \dots Ec. (2)$$

donde V es la energía potencial del sistema y r es la posición de la partícula.

Así, al simplificar estas dos ecuaciones se obtiene:

$$- \frac{dV}{dr} = m \frac{d^2r}{dt^2} \dots Ec. (3)$$

Entonces, como se expresa en la *Ec. 3* las simulaciones de dinámica molecular relacionan el cambio de la energía potencial respecto a la variación de la posición de una partícula como una función del tiempo mediante la ecuación de movimiento de Newton.

En las simulaciones, las aceleraciones y velocidades que actúan sobre cada átomo se calculan utilizando la ley de movimiento de Newton, mediante un campo de fuerzas. Un campo de fuerzas es una colección de ecuaciones y constantes

asociadas diseñadas para reproducir la geometría molecular y propiedades seleccionadas de estructuras probadas.

De la integración de las ecuaciones de movimiento se obtiene la trayectoria que describe las posiciones, velocidades y aceleraciones de las partículas respecto al tiempo. Los campos de fuerzas comúnmente utilizados son: Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics (CHARMM), Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER), Groningen molecular simulation (Gromos) y Optimized Potentials for Liquid Simulations (OPLS).

En las simulaciones de dinámica molecular, una molécula se describe como una serie de puntos cargados (átomos) unidos por resortes (enlaces) y los campos de fuerza se utilizan para describir la evolución temporal de las longitudes de los enlaces, los ángulos y las torsiones de enlace; así como las interacciones de van der Waals y las electrostáticas entre los átomos.

Por ejemplo, el archivo de parámetros del campo de fuerzas CHARMM contiene las constantes numéricas necesarias para evaluar fuerzas y energías dado un archivo de estructura y las coordenadas atómicas en el tiempo (trayectoria).

La *Ec.4* muestra la función de energía potencial del campo de fuerzas CHARMM36m:

$$V_{CHARMM} = V_{intra} + V_{inter} \dots Ec. (4)$$

donde V_{intra} se refiere a las interacciones enlazantes: contribuciones debidas a los enlaces covalentes (*Ec.6*), ángulos de enlace (*Ec.7*) y ángulos de torsión propios (*Ec.8*) e impropios (*Ec.9*); como describe la *Ec.5*.

$$V_{intra} = V_{estiramiento} + V_{angular} + V_{diédro} + V_{impropios} + V_{Urey-Bradley} + V_{CMAP} \dots Ec. (5)$$

Así, cada una de estas fuerzas se calcula a partir de un pseudo potencial empírico:

$$V_{estiramiento} = \sum_{enlaces} k_i (r_i - r_0)^2 \dots Ec. (6)$$

donde k_i es la constante de fuerza de enlace y $r_i - r_0$ es la distancia del equilibrio que el átomo se ha movido.

$$V_{angular} = \sum_{angulos} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \dots Ec. (7)$$

donde k_θ es la constante de fuerza angular y $\theta - \theta_0$ es el ángulo del equilibrio entre 3 átomos enlazados.

$$V_{diédro} = \sum_{diédros} k_\varphi ((1 + \cos(n\varphi - \delta)) \dots Ec. (8)$$

donde k_φ es la constante de fuerza diedral, n es la multiplicidad de la función, φ es el ángulo diedro y δ es el cambio de fase.

$$V_{impropios} = \sum_{impropios} k_w (w - w_0)^2 \dots Ec. (9)$$

donde k_w es la constante de fuerza y $w - w_0$ es el ángulo fuera del plano.

El componente de Urey-Bradley (para la flexión angular usando interacciones 1-3 no ligadas) comprende el quinto término, donde k_{UB} es la constante de fuerza respectiva y $b_{1-3} - b_{1-3,0}$ es la distancia entre los átomos 1,3 en el potencial armónico y se expresa mediante la Ec. 10.

$$V_{Urey-Bradley} = \sum_{Urey-Bradley} k_{UB} (b_{1-3} - b_{1-3,0})^2 \dots Ec. (10)$$

El último término que conforma a las interacciones intramoleculares es para los valores Φ, Ψ (ángulo diedro de la cadena principal), descrito mediante tablas o matrices empíricas de corrección de energía (CMAP) como se expresa en la Ec. 11. Puede, en principio, aplicarse a cualquier par de ángulos diedros, pero se

usa en el campo de fuerzas CHARMM actual para mejorar las propiedades conformacionales de las cadenas principales de proteínas.

$$V_{CMAP} = \sum_{\text{aminoácidos}} v_{CMAP}(\Phi, \Psi) \dots Ec(11)$$

Mientras que el término V_{inter} de la Ec.4 se refiere a las interacciones no enlazantes: de atracción-repulsión de tipo Lennard-Jones para las fuerzas de van der Waals (Ec.13) y un término Coulómbico para las interacciones electrostáticas (Ec.14) como se expresa en la Ec.12.

$$V_{inter} = V_{LJ} + V_{elec} \dots Ec. (12)$$

Por definición, las fuerzas no enlazantes solo se aplican a pares de átomos separados por al menos tres enlaces. La energía de van der Waals (VDW) se calcula con el potencial estándar Lennard-Jones o potencial 12-6 (Ec.13).

$$V_{Lennard-Jones} = \sum_{\text{átomos no vinculados}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \dots Ec. (13)$$

Donde ϵ es la profundidad del potencial entre el par de átomos ij y se calcula como la media geométrica $\epsilon_{ij} = \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j}$; r es la distancia entre los átomos y r_{ij}^{min} es la distancia en la que el potencial se encuentra en un mínimo y se calcula como la media aritmética $r_{ij}^{min} = \frac{r_i^{min} + r_j^{min}}{2}$. ϵ_i y r_i al igual que ϵ_j y r_j son parámetros empíricos que corresponden a los átomos i y j según su naturaleza.

El potencial electrostático se calcula con la ley de Coulomb (Ec.14).

$$V_{interacciones electrostáticas} = \sum_{\text{átomos no vinculados}} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \dots Ec. (14)$$

q_i y q_j son las cargas puntuales de cada átomo, r_{ij} la distancia entre ellos y ϵ la constante dieléctrica del medio que los separa

Los valores de los términos de referencia anteriormente mencionados (como k_θ en $V_{estiramiento}$, θ_0 en $V_{angular}$, etc.), las diversas constantes de fuerza (k_i , k_θ , etc.), así como los parámetros Lennard-Jones (ϵ_{ij} , r_{ij}^{min}) y las cargas parciales del potencial electrostático (q_i , q_j) se toman de los parámetros empíricos del campo de fuerzas.

Así, al realizar una simulación de dinámica molecular, es posible integrar las coordenadas, velocidades y fuerzas de los átomos en dicho sistema en función del tiempo para seguir los procesos dinámicos y determinar propiedades estadísticas que pueden estudiarse en detalle para poder calcular valores termodinámicos como la energía libre de unión (afinidad), la flexibilidad del receptor inducida por el ligando, la cinética de unión a ligando, entre otros (Hospital, A. *et al.*, 2015).

4. Metodología.

El desarrollo del presente proyecto consistió en dos partes principales:

- 1) la simulación de dinámica molecular y
- 2) el análisis y comparación con resultados experimentales.

Para la primera parte, se siguió la metodología descrita en la Figura 8.

La segunda parte se describe en la sección **5 Resultados y discusión**.

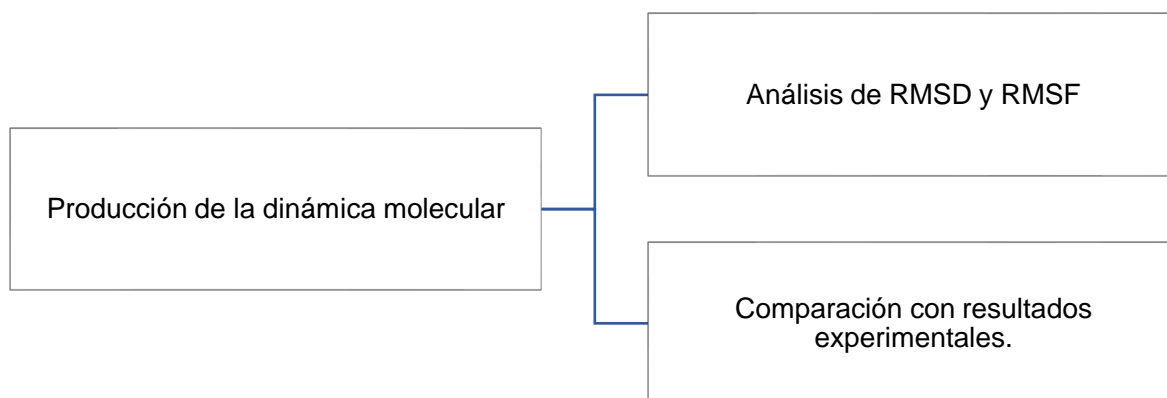


Figura 8. Etapas generales de este proyecto.

Para la preparación de las proteínas en la membrana lipídica se siguió la metodología esquematizada en la Figura 9.

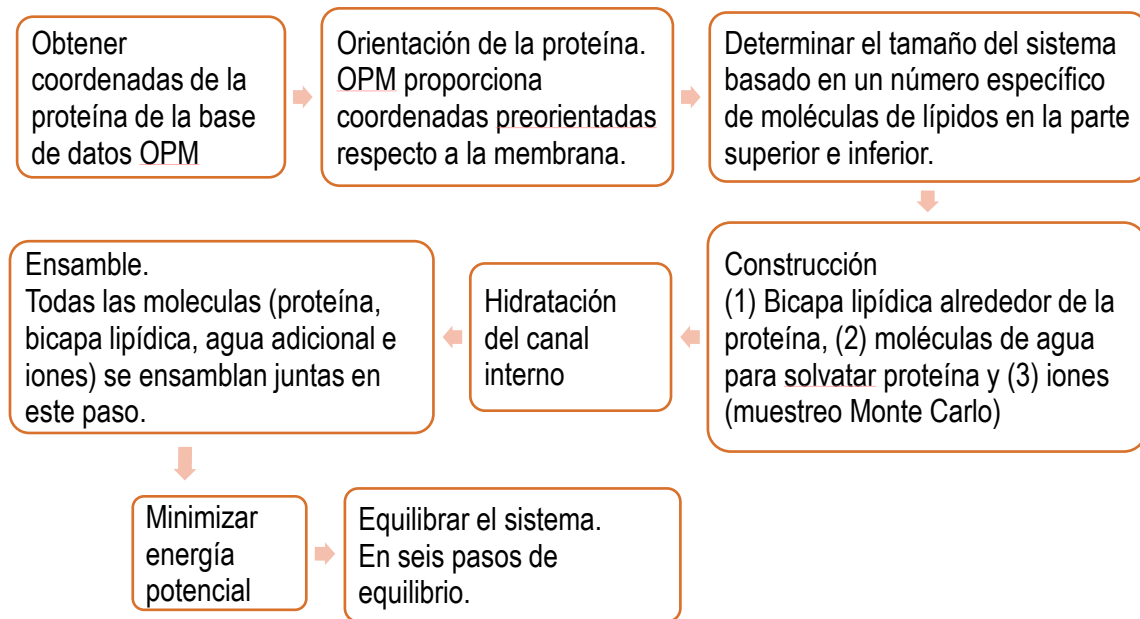


Figura 9. Etapas para la preparación de los sistemas para las simulaciones de dinámica molecular.

Las coordenadas de las moléculas de interés se obtuvieron de la base de datos OPM (*Orientations of Proteins in Membranes*). La opsina (PDBID: 3CAP) se encuentra reportada con una resolución de 2.9 Å (Park, J. H. *et al.*, 2008) y la rodopsina (PDBID: 1F88) con una resolución de 2.8 Å (Palczewski, K. *et al.*, 2000).

Para construir los sistemas se utilizó CHARMM-GUI HMMM Builder (Wu, E. L. *et al.*, 2014). Esta interfaz permitió orientar las estructuras de las proteínas respecto a sus coordenadas en la OPM, se conservaron las moléculas de agua reportados en las estructuras depositadas en el PDB (*Protein Data Bank*). Debido a que en la proteína inactiva el enlace del retinal con el aminoácido Lys296 es covalente, se conservó la carga positiva de esta unión y la carga negativa del Glu113; además, la interfaz permite realizar la parametrización de este ligando. Se construyó una membrana lipídica con colesterol, así como los ácidos grasos poliinsaturados 1-estearoil-2-docosahexaenoil-fostatidilcolina (SDPC) y 1-estearoil-2-docosahexaenoil-fostatidiletanolamina (SDPE) en proporciones 1:2:2 y se

equilibraron a una temperatura de 311 K, de acuerdo con lo reportado anteriormente (Grossfield, A., Feller, S. E. & Pitman, M. C., 2006). La composición de sistemas construidos se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de las bicapas lipídicas de los sistemas generados

Molécula	Opsina (PDB ID 3CAP)	Rodopsina (PDB ID 1F88)
Colesterol	50	50
SDPC	100	100
SDPE	100	100

Se añadieron iones Na^+ y Cl^- a una concentración 150 mM (fisiológica), de acuerdo con lo reportado anteriormente (Grossfield, A., Feller, S. E. & Pitman, M. C., 2006).

Se sabe que el núcleo hidrofóbico de los GPCR aloja moléculas de agua que conectan las partes distantes de la proteína mediante residuos conservados para permitir la activación de la proteína afín, formando enlaces de hidrógeno (Grossfield, A. *et al.*, 2008; Leioatts, N. *et al.*, 2014). Por lo que se buscó ocupar el interior de la proteína con moléculas de agua. Para ello, se realizó una simulación de 2 ns en la que se colocó a la opsina, dentro de una caja de moléculas de agua y se restringió la posición de la proteína, ello para permitir el paso de moléculas de agua al interior. Posteriormente, se eliminaron las moléculas de agua que no se encontraban dentro de la proteína y después se alineó la cadena principal de dicha proteína respecto al sistema que contenía a la proteína, lípidos, moléculas de agua e iones.

Una vez alineados ambos sistemas se eliminaron las coordenadas de la proteína de uno de los sistemas y se escribieron las coordenadas de este nuevo sistema que contenía las coordenadas de proteína, lípidos, moléculas de agua (del canal interno y del exterior de la membrana) e iones. Se repitieron estos pasos para la proteína en su estado inactivo.

Una vez que se logró obtener a cada proteína dentro de su bicapa lipídica se minimizó la energía del sistema utilizando el campo de fuerzas CHARMM36m.

El siguiente paso fue la etapa de equilibrio de los sistemas. Este proceso consistió en seis etapas, relajando en cada una de éstas diferentes átomos del sistema y con diferentes tiempos.

Posteriormente, se generaron los archivos de entrada para producir las simulaciones de 100 ns que se realizaron en 1 GPU NVIDIA Tesla M2090 utilizando el paquete GROMACS 5.0.4. El paso de tiempo en dichas simulaciones fue de 2 fs.

La temperatura se mantuvo constante a 311 K con 3 termostatos Nose-Hoover separados para las moléculas de la proteína, membrana y el último para el agua e iones; con un paso de tiempo de 1.0 ps. Mientras que, la presión se mantuvo acoplada isotrópicamente en la dirección x y y , pero diferente en la dirección z a $4.5e^{-5}$ bar⁻¹ por barostatos Parrinello-Rahman usando una constante de tiempo de 5.0 ps.

El análisis de las simulaciones se realizó con los programas que ofrece el paquete GROMACS 5.0.4, se realizaron alineamientos estructurales con PyMol 2.2 y se analizó la probabilidad de ocupación de moléculas de agua dentro la proteína utilizando la implementación *trj_cavity* para el paquete GROMACS (Paramo, T. *et al.*, 2014)

5. Resultados y discusión.

Una vez que se tuvieron los dos sistemas equilibrados, se generaron las correspondientes simulaciones de 100 ns. El análisis de estas simulaciones se dividió en dos partes:

- 1) Análisis de la flexibilidad de ambos sistemas mediante el RMSD y la fluctuación de los aminoácidos durante la simulación mediante su RMSF; y
- 2) Comparación con resultados experimentales: se acoplaron las coordenadas de los sistemas al finalizar las simulaciones con la subunidad α de la transducina previamente reportada en el PDB (PDBID: 3DQB) para comparar si era posible la interacción, así como la probabilidad de formación de redes de moléculas de agua extendidas dentro de cada sistema.

Los sistemas construidos se muestran en las Figuras 10 y 11.

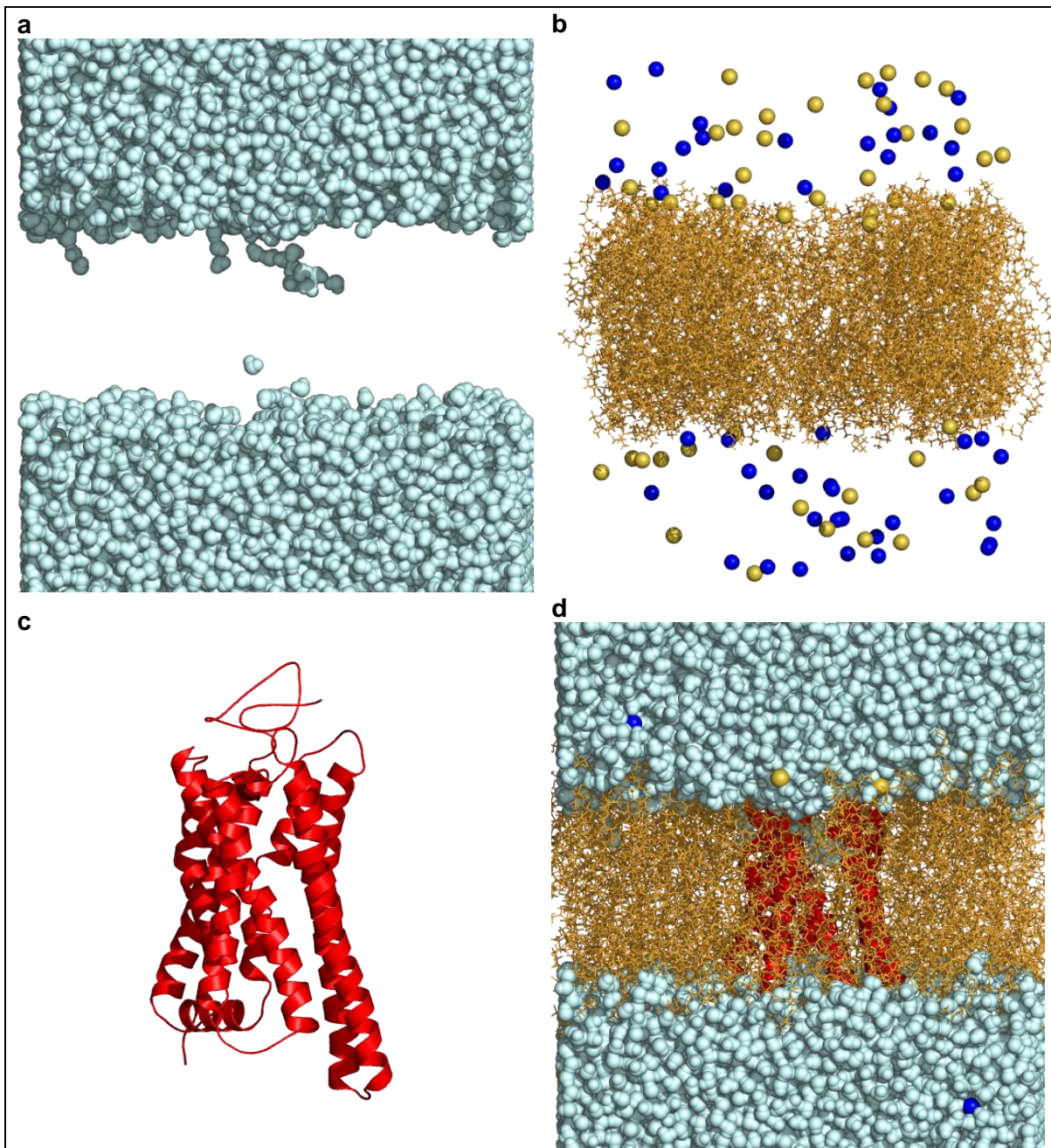


Figura 10 Visualización del sistema construido con CHARMM-GUI de la opsina. a) las moléculas de agua en esferas color azul, b) la bicapa lipídica en líneas color naranja e iones de sodio en color amarillo y de cloro en color azul. c) la opsina en color rojo. Finalmente, en d) el sistema completo.

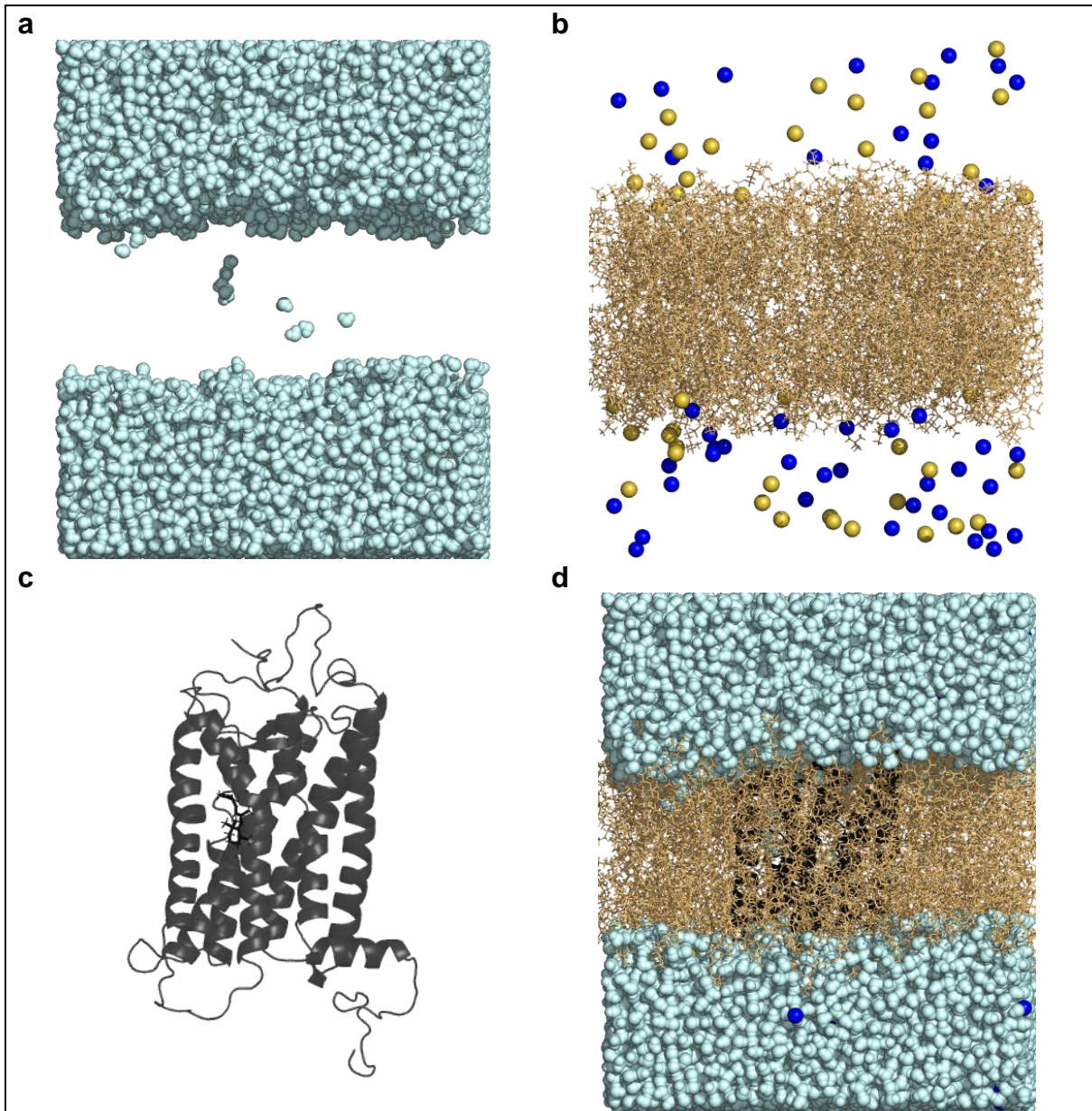


Figura 11. Visualización del sistema construido con CHARMM-GUI de la rodopsina. a) las moléculas de agua en esferas color azul, b) la bicapa lipídica en líneas color naranja, iones de sodio en color amarillo y de cloro en color azul. c) la proteína y el agonista inverso en color negro. Finalmente, en d) el sistema completo.

En el trabajo reportado por Shrestha, U. R. *et al.* (2016) se analizó a la rodopsina (estado inactivo) y a la opsina. Esta última debido a su similitud estructural con la proteína en el estado activado. Para evaluar dicha similitud, se alinearon las cadenas principales de la proteína rodopsina en su estado activo, también llamado

metarodopsina II (PDBID: 3PXO), inactivo (PDBID: 1F88) y de la apoproteína (PDBID: 3CAP), dichas estructuras se obtuvieron de la base de datos PDB (Berman, H. M. *et al.*, 2000). Se analizaron los alineamientos realizados por pares y se observó, mediante el RMSD entre los átomos pesados de la cadena principal, que la estructura de la Metarodopsina II (proteína activa) es similar a la de la opsina (RMSD= 0.275), la diferencia se incrementó al comparar la proteína en su estado activo respecto a la rodopsina o estado inactivo (RMSD= 1.486) y se encontró que existe una mayor desviación de esta medida al alinear los átomos de la la opsina con la rodopsina (RMSD= 1.522) como se resume en la Figura 12.

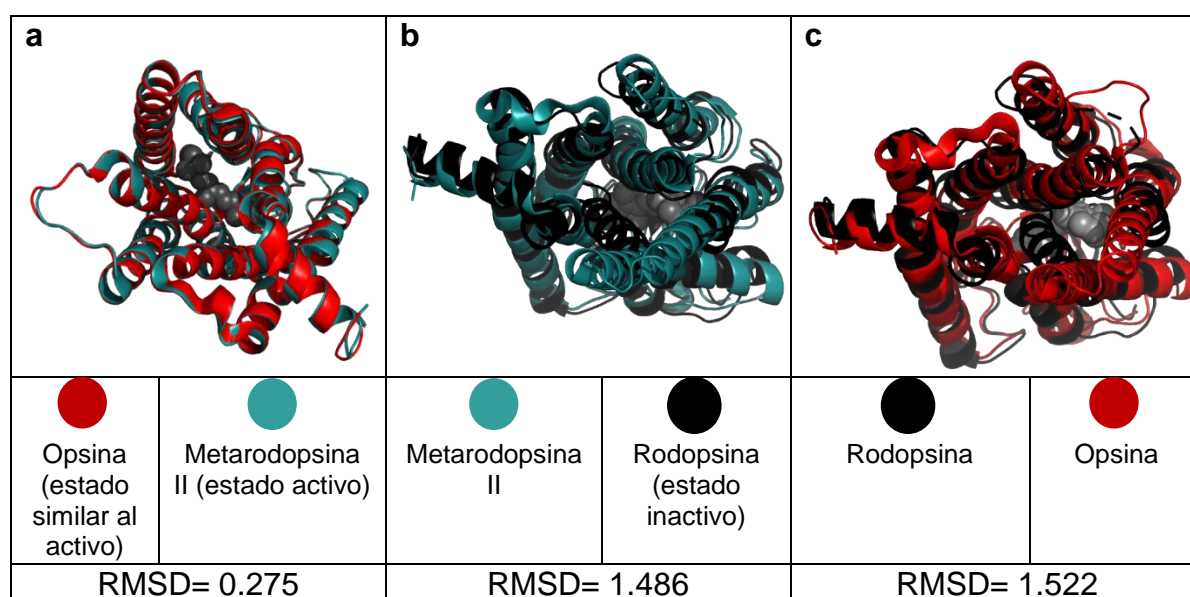


Figura 12. Alineamiento de las estructuras de la proteína rodopsina en diferentes etapas del ciclo de activación. a) En rojo se muestra la estructura de la opsina (PDBID: 3CAP) y en azul de la metarodopsina II, la cual tiene unido al *trans*-retinal. b) En negro se muestra a estructura de la rodopsina (unida al 11-*cis*-retinal, en color gris) alineada con la estructura de la proteína en la conformación metarodopsina II (3PXO). c) Alineamiento de la estructura de la rodopsina (PDBID: 1F88) con la opsina y manteniendo el código de colores (opsina en rojo, rodopsina en negro y retinal en gris).

Este alineamiento permitió observar que existe similitud estructural entre la estructura de la metarodopsina II y la estructura de la opsina. Mientras que la rodopsina y la opsina son estructuralmente diferentes.

Dado que la conformación de la opsina resultó comparable a la de metarodopsina II (estado activo) y en virtud de la disponibilidad de información experimental de la flexibilidad de la opsina (estado cercano al activo), se procedió a comparar la opsina con la rodopsina (estado inactivo).

Para observar los cambios en las cadenas laterales y principales de los aminoácidos constituyentes de ambos sistemas, se midió la distancia promedio (RMSD) entre los átomos pesados de las proteínas respecto a los de los sistemas en el primer cuadro de las simulaciones de producción, Figura 13.

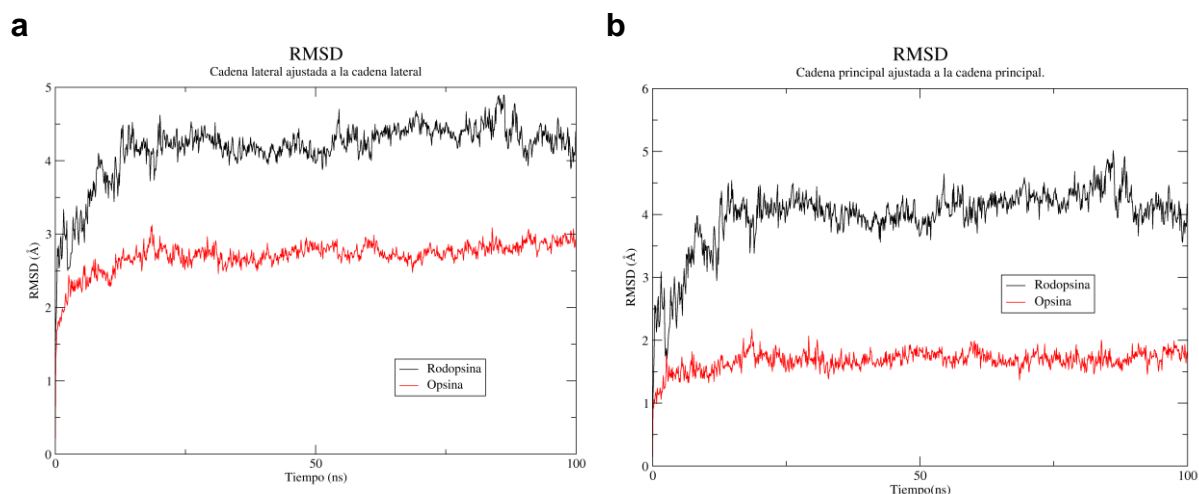


Figura 13. RMSD promedio de los átomos pesados de los sistemas. a) cadenas laterales y b) cadena principal. En color negro se muestra el cálculo para la rodopsina y en rojo para la opsina.

Esta medida permitió observar la diferencia promedio de la posición de los átomos pesados en la cadena lateral y de los átomos pesados de la cadena principal a lo largo de la simulación. Para la opsina (estado cercano al activo) se obtuvo una diferencia de 3.12 Å y 2.18 Å en el RMSD respectivamente; mientras que para la rodopsina (estado inactivo) fue de 3.53 Å y 4.44 Å en el RMSD.

La evolución del RMSD durante la simulación muestra que la opsina (estado cercano al activo) tiende a estabilizarse con mayor facilidad que la rodopsina (estado inactivo). Es decir, las posiciones de los átomos en la opsina (estado cercano al activo) durante la producción de la simulación tienen menores fluctuaciones respecto a sus posiciones al inicio de la simulación, en comparación con la rodopsina (estado inactivo) cuyos átomos presentaron mayor movimiento durante la producción de la simulación respecto al estado inicial. Esto coincide con lo observado experimentalmente (Shrestha, U. R. *et al.*, 2016), es decir, que: i) en la opsina (estado cercano al activo) los cambios conformacionales no están favorecidos y ii) la flexibilidad de la rodopsina (estado inactivo) puede atribuirse a la presencia del agonista inverso 11-*cis*-retinal, al ser ésta la diferencia fundamental entre los dos sistemas.

Entonces, se analizó la desviación cuadrática de los residuos (o *Root-Mean-Square Fluctuation*, RMSF por sus siglas en inglés), para conocer la fluctuación media cuadrática (es decir, la desviación estándar) de las posiciones atómicas en la trayectoria durante los 100 ns de simulación, respecto a la posición atómica en el sistema al equilibrio, Figura 14.

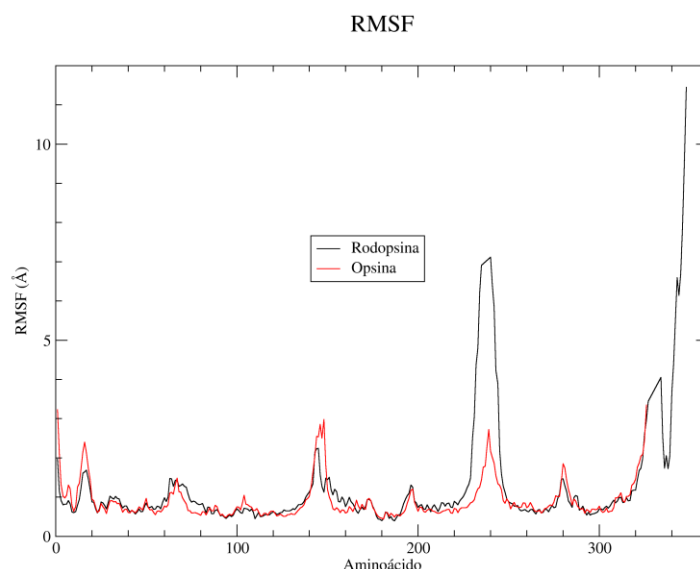


Figura 14. Fluctuaciones de la posición de los aminoácidos de las proteínas durante las simulaciones.

Al analizar la evolución del RMSF durante la simulación, y como era de esperarse, se observó que los aminoácidos que constituyen los lazos extra e intracelulares presentan mayor libertad de movimiento que los que conforman las regiones transmembranales. Se obtuvo una diferencia de 5 Å en Thr243 y superior a 1 Å en la región que comprenden los aminoácidos 230-245 de la rodopsina (estado inactivo) respecto a los de la opsina (estado cercano al activo). Estos aminoácidos forman el lazo intracelular 3 (ICL3). Entonces, se buscaron los hallazgos experimentales involucrados con el movimiento de estos aminoácidos.

Scheerer, P. *et al.* (2008) obtuvieron la estructura cristalina del complejo entre la opsina en su forma activa y la subunidad α de la proteína G (PDBID: 3DQB, 3.2 Å). Compararon la estructura de este complejo con el de la rodopsina y encontraron que:

1. En la estructura del complejo la hélice TM6 se inclina hacia afuera del haz helicoidal en 6-7 Å con Trp265 como punto de pivote y
2. Debido al re-arreglo de las TM5 y TM6, se abre un espacio en el que el péptido de la proteína G se une al receptor.

Tomando como referencia este hallazgo, se alinearon las coordenadas de la estructura encontrada con las estructuras de los sistemas generados en el presente trabajo. Para ello, se obtuvieron las estructuras finales de los sistemas, tras 100 ns de simulación, y se alinearon con la estructura reportada en el PDB por dicho grupo. El resultado de este alineamiento se muestra la Figura 15.

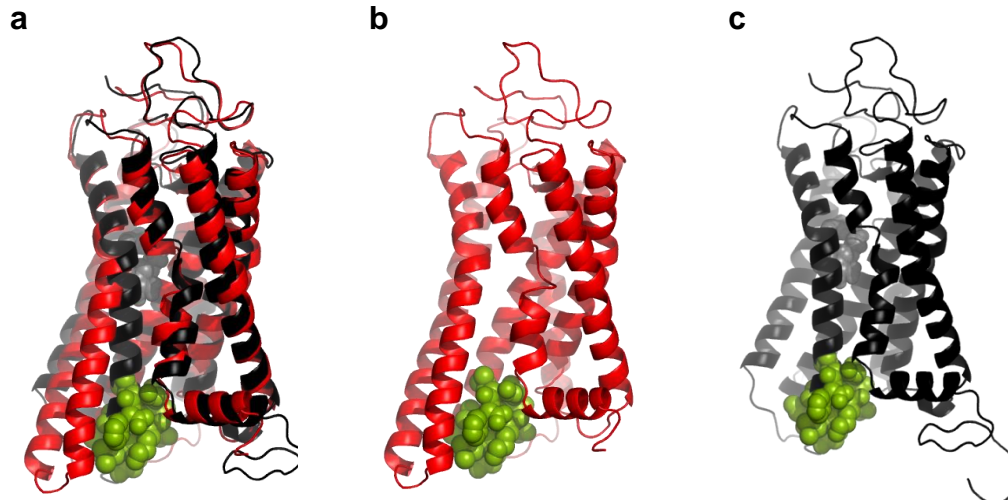


Figura 15. Alineamiento de las estructuras de la proteína rodopsina en diferentes etapas del ciclo de activación con la subunidad alfa de la proteína transducina. a) Ambas conformaciones de la proteína rodopsina (opsina en color rojo y en color negro rodopsina) con la subunidad alfa (esferas color verde). b) Estructura de la opsina alineada con la subunidad alfa de la proteína transducina c) Alineamiento de la subunidad alfa de la proteína transducina con la estructura de la rodopsina.

En la Figura 15b es posible apreciar que transcurridos 100 ns de simulación, el espacio que se ha generado en la región citoplasmática de la opsina, permite el acoplamiento de las coordenadas de la subunidad α de la proteína transducina. Mientras que al superponer la estructura de la rodopsina con la de la subunidad α (Figura 15c), este acoplamiento en la parte citoplásmica del haz helicoidal no es posible, lo que sugiere que las interacciones moleculares de los residuos conservados son clave en el mecanismo de activación de este receptor. Esta diferencia nos llevó a buscar cuáles eran los aminoácidos que estaban teniendo movimiento en las hélices de la estructura de la proteína en el estado similar al activo (opsina) y no en la rodopsina (estado inactivo).

Mediante resonancia magnética nuclear en estado sólido, Kimata, N., Reeves, P. J. y Smith, S. O. (2015) reportaron que el efecto del movimiento de la TM6 genera la apertura de una cavidad para la unión a la proteína G afín (transducina) en el

lado intracelular del receptor. En ese mismo trabajo propusieron que el movimiento de la TM6 está asociado con la rotación de dos residuos de tirosina altamente conservados: Tyr223 (en la TM5) y Tyr306 (en la TM7), hacia el interior del receptor. Éste último residuo forma parte de la secuencia NPxxY altamente conservada y con una identidad del 96% en los GPCR. Tras la activación, estas moléculas de tirosina interrumpen el enlace que une la TM3 a TM6 mediante Arg135-Glu247 en el lado intracelular de la rodopsina en el estado inactivo. El aminoácido Arg135 tiene 97% de identidad y es parte de la secuencia ERY conservada al final de TM3.

Se midió la distancia entre los carbonos α de los aminoácidos Arg135 y Glu247, para evaluar su comportamiento durante la simulación en el estado similar al activo (opsina) y en el estado inactivo (rodopsina; Figura 16).

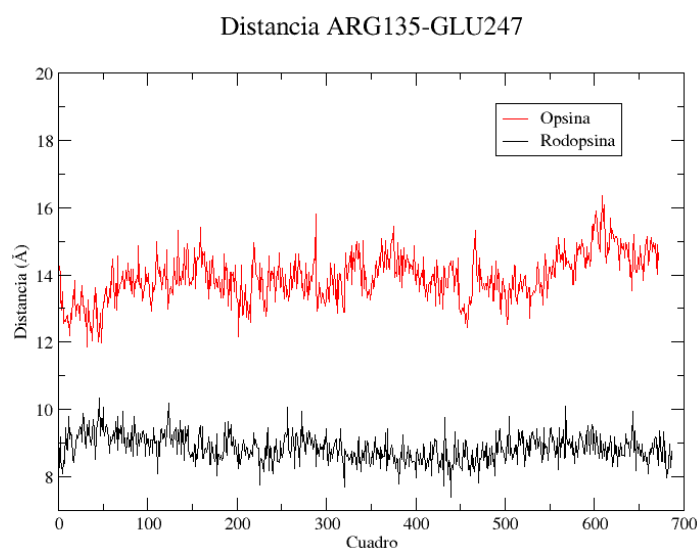


Figura 16. Evaluación de la distancia entre los carbonos α de los aminoácidos Arg135 y Glu247 durante simulación.

Durante la trayectoria de la producción, la distancia promedio entre los carbonos α de dichos aminoácidos en el estado similar al activo (opsina) fue 13.92 ± 0.69 Å.

Mientras que en la proteína en el estado inactivo (rodopsina) dicha distancia promedio fue de $8.86 \pm 0.41 \text{ \AA}$.

Se encontró que las coordenadas atómicas de dichos aminoácidos se desplazaron en el sistema opsina, dando lugar a una cavidad en la zona intracelular. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado experimentalmente por dicho grupo. Así, fue posible apreciar que, en la opsina, debido cambio en orientación que tienen los residuos de tirosina (223 y 306), los aminoácidos Arg135 y Glu247 pierden cercanía, esto explica la apertura de la cavidad, previamente observada, mediante la que el receptor interactúa con la proteína G afín (transducina).

Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo (Leioatts, N. *et al.*, 2014) se determinó que existe una diferencia en la hidratación en la rodopsina (estado inactivo) y el primer estado activo de la proteína (Meta I). Es decir, se encontró que existe un incremento en la hidratación de la proteína luego de la fotoactivación. Entonces, en este proyecto, se comparó la hidratación de la opsina (estado cercano al activo) y de la rodopsina (estado inactivo) Figura 17.

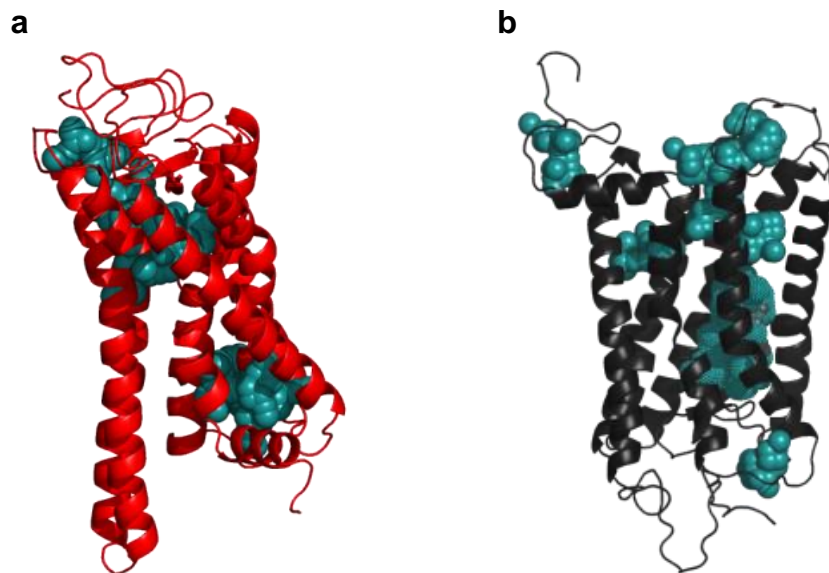


Figura 17. Comparación de la hidratación, al finalizar 100 ns de simulación. a) opsina (estado cercano al activo) y b) rodopsina (estado inactivo).

En la Figura 17b es posible observar en la rodopsina (estado inactivo) la formación de una red de moléculas de agua, necesarias para la transmisión de la señal iniciada por el fotón hasta el retinal, con lo que se inducen cambios conformacionales en el agonista inverso y en las hélices transmembranales del receptor para permitir la interacción con la proteína G afín (transducina). Dichos cambios no son necesarios en la opsina (estado cercano al activo) pues ya ha sufrido dichas transformaciones y, por ello, no se observan las moléculas de agua en la figura 17a.

6. Conclusiones

En el presente trabajo se analizaron dos sistemas; uno en presencia del agonista inverso 11-*cis*-retinal y otro en ausencia de este. Los resultados obtenidos fueron consistentes con evidencia experimental reportada en la literatura. En ambos sistemas se incluyó la membrana lipídica, moléculas explícitas de agua e iones (para conferir características lipídicas y osmolares similares a las encontradas en la célula). Se realizaron simulaciones de dinámica molecular de todos los átomos de dichos sistemas durante 100 ns y se encontró lo siguiente:

- 1) El análisis de la evolución del RMSD de ambos sistemas permitió observar que en la rodopsina hubo un cambio conformacional mayor respecto a la posición inicial. En el caso de la opsina el cambio conformacional respecto a la posición inicial fue menor. Al ser la presencia del agonista inverso la diferencia entre ambos sistemas se atribuye a éste el cambio.
- 2) Al comparar las fluctuaciones en los aminoácidos durante la simulación (o RMSF) fue posible determinar que los aminoácidos que constituyen el lazo intracelular 3 presentan mayor movilidad en la rodopsina respecto a los mismos en la opsina. Notablemente, dichos aminoácidos unen TM5 y TM6 que se sabe están involucradas el cambio conformacional de la proteína del estado inactivo al activo. Por lo tanto, los cambios en ICL3 parecen estar relacionados con el proceso de activación de la proteína.
- 3) La diferencia en las conformaciones del estado inactivo respecto al activo se evaluó mediante la distancia entre los aminoácidos Arg135-Glu247. En la rodopsina esta distancia fue de $8.86 \pm 0.41 \text{ \AA}$, mientras que en la opsina estos aminoácidos se encuentran más distantes ($13.92 \pm 0.69 \text{ \AA}$). Además, los sistemas presentan diferente orientación de los aminoácidos Tyr223 y Tyr306. Este movimiento es relevante ya que está relacionado con la interacción con la transducina, que lleva a cabo la

señalización hacia el interior de la célula. Al involucrar el movimiento de aminoácidos conservados (Arg135 y Tyr306) resulta un cambio clave para los GPCRs de la familia de la rodopsina.

- 4) Finalmente, fue posible proponer que el movimiento de las moléculas de agua para la formación de un canal dentro la proteína en el estado inactivo permite que la transducción de la señal iniciada por el fotón en la zona extracelular se lleve a cabo.

Al ser rodopsina la proteína prototipo de los receptores acoplados a proteínas G estos resultados aportan al conocimiento del mecanismo de activación común de los GPCRs.

7. Perspectivas

a) Explorar la influencia del agonista todo-*trans*-retinal en la flexibilidad en el estado activo de la proteína (metarodopsina II) y comparar los resultados en este trabajo de tesis, la opsina. Esto involucrará simulaciones de dinámica molecular y comparación con datos experimentales reportados.

b) En nuestro grupo de trabajo existe interés por receptores de opioides, en particular el receptor opioide μ . Las conclusiones encontradas en el sistema prototipo, rodopsina, servirán como base para evaluar si las diferencias en las fluctuaciones en la rodopsina se presentan también en el receptor opioide μ .

Los receptores opioides pertenecen a los GPCR clase A (también llamados tipo rodopsina), están involucrados en el control del dolor, la recompensa y la adicción; por lo que son el principal blanco terapéutico para el control de dolor agudo, crónico y post-operatorio. Sin embargo, el desarrollo de tolerancia, dependencia y adicción dificultan su uso clínico. Actualmente, se cuenta con bases de datos que ofrecen amplia información de los agonistas y antagonistas que se unen a los receptores opioides. Mediante la metodología Descubrimiento de información en bases de datos (KDD, por sus siglas en Ingles), será posible investigar patrones estructurales que permitan comprender posibles modos de unión y mecanismos de activación, para con ello, ayudar al desarrollo de nuevos ligandos con mejores perfiles farmacológicos, *i.e.*, con menores efectos adversos.

Contribuyendo en esta dirección se realizó la compilación de una base de datos con 130 moléculas que presentan afinidad por el receptor opioide μ , como lo muestra la Figura 18.

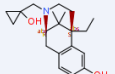
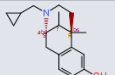
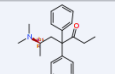
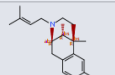
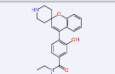
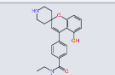
ligand	Structure of smiles	smiles	Action	pubmed_id
(-)-bremazocine		<chem>CC[C@]12CC</chem>	Antagonist	9686407
(-)-cyclazocine		<chem>Oc1ccc2c(c1)</chem>	Partial agonist	9686407
(-)-methadone		<chem>CCC(=O)C(c1</chem>	Agonist	9686407
(-)-pentazocine		<chem>CC(=CCN1CC</chem>	Partial agonist	9686407
ADL5747		<chem>CCN(C(=O)c1</chem>	Agonist	19694468
ADL5859		<chem>CCN(C(=O)c1</chem>	Agonist	18788723

Figura 18 Fragmento de la base de datos de ligandos para el receptor opioide μ .

Como un primer paso, las estructuras se clasificaron según su acción y efectos sobre el tipo de receptor en donde se fijan e interactúan en: agonistas (como la morfina), antagonistas (naloxona y naltrexona) y agonistas parciales (buprenorfina).

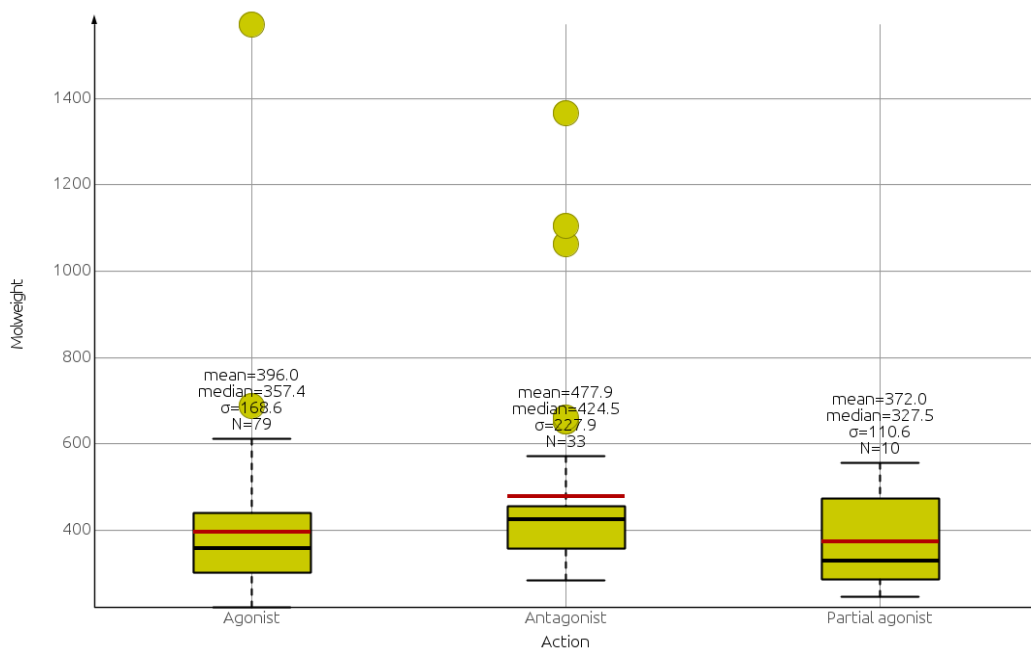


Figura 19 Distribución de la acción de las moléculas sobre el receptor μ respecto a sus pesos moleculares.

De las 130 moléculas que comprenden la base de datos: 81 actúan como agonistas, 39 como antagonistas y 10 como agonistas parciales. En los gráficos de caja y bigotes de la Figura 19 es posible observar el peso molecular promedio que tienen las moléculas para cada modo de acción sobre el receptor μ (396, 478 y 372 g/mol, respectivamente). Dada la diferencia en modulación presentada por cada una de estas moléculas al receptor opioide μ , y tomando en cuenta la diferencia encontrada entre la opsina y la rodopsina (estado inactivo) se puede postular que los agonistas del receptor opioide μ tendrían una dinámica similar a la observada en la opsina y que los antagonistas deberían comportarse en su dinámica molecular, como la rodopsina (estado inactivo). Los correspondientes estudios de dinámica molecular de estos sistemas permitirán corroborar esta hipótesis.

8. Referencias

- Ballesteros, J. A. & Weinstein, H. (1995). Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences*, 25, 366–428.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242.
- Ernst, O. P., Lodowski, D. T., Elstner, M., Hegemann, P., Brown, L. S. & Kandori, H. (2014). Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. *Chemical Reviews*, 114(1), 126–163.
- Gonzales, P. (2012). Receptores acoplados a proteínas G: Entendiendo cómo responde nuestro organismo a señales diversas. *Revista de Química*, 26(1–2), 16–19.
- Grossfield, A., Feller, S. E. & Pitman, M. C. (2006). A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by omega-3 polyunsaturated lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 4888–4893.
- Grossfield, A., Pitman, M. C., Feller, S. E., Soubias, O. & Gawrisch, K. (2008). Internal Hydration Increases during Activation of the G-Protein-Coupled Receptor Rhodopsin. *Journal of Molecular Biology*, 381(2), 478–486.
- Ho, T. T., Nguyen, J. T., Liu, J., Stanczak, P., Thompson, A. A., Yan, Y. G., Chen, J., Allerston, C. K., Dillard, C. L., Xu, H., Shoger, N. J., Cameron, J. S., Massari, M. E. & Aertgeerts, K. (2017). Method for rapid optimization of recombinant GPCR protein expression and stability using virus-like particles. *Protein Expression and Purification*, 133, 41–49.

- Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M. & Gelpí, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry: AABC*, 8, 37–47.
- Johns, S. J. (n.d.). TOPO2, Transmembrane protein display software. <http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/>. Consultado el: 07-07-18.
- Katritch, V., Cherezov, V. & Stevens, R. C. (2013). Structure-Function of the G Protein–Coupled Receptor Superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53(1), 531–556.
- Kimata, N., Reeves, P. J. & Smith, S. O. (2015). Uncovering the triggers for GPCR activation using solid-state NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 253, 111–118.
- Kobilka, B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(4), 794–807.
- Latorraca, N. R., Venkatakrisnan, A. J. & Dror, R. O. (2017). GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chemical Reviews*, 117(1), 139–155.
- Lau, P.-W., Grossfield, A., Feller, S. E., Pitman, M. C. & Brown, M. F. (2007). Dynamic Structure of Retinylidene Ligand of Rhodopsin Probed by Molecular Simulations. *Journal of Molecular Biology*, 372(4), 906–917.
- Leioatts, N., Mertz, B., Martínez-Mayorga, K., Romo, T. D., Pitman, M. C., Feller, S. E., Grossfield, A. & Brown, M. F. (2014). Retinal Ligand Mobility Explains Internal Hydration and Reconciles Active Rhodopsin Structures. *Biochemistry*, 53(2), 376–385.
- Lindahl, E. R. (2008). Molecular Dynamics Simulations. In A. Kukol (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 443, pp. 3–23). Totowa, NJ.: Humana Press.

- Madariaga-Mazón, A., Marmolejo-Valencia, A. F., Li, Y., Toll, L., Houghten, R. A. & Martínez-Mayorga, K. (2017). Mu-Opioid receptor biased ligands: A safer and painless discovery of analgesics? *Drug Discovery Today*, 22(11), 1719–1729.
- Martínez-Mayorga, K., Pitman C., Michael, Grossfield, Alan, Feller E., S. and & Brown F., M. (2006). Retinal Counterion Switch Mechanism in Vision Evaluated by Molecular Simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 128(51), 16502–16503.
- 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). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5480), 739–745.
- Paramo, T., East, A., Garzón, D., Ulmschneider, M. B. & Bond, P. J. (2014). Efficient Characterization of Protein Cavities within Molecular Simulation Trajectories: trj_cavity. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(5), 2151–2164.
- Park, J. H., Scheerer, P., Hofmann, K. P., Choe, H.-W. & Ernst, O. P. (2008). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*, 454(7201), 183–187.
- Perpiñá Tordera, M. (2017). El sabor amargo y el olor en el asma. *Revista de Asma*, 2(1), 1–8.
- Pope, A., Eilers, M., Reeves, P. J. & Smith, S. O. (2014). Amino acid conservation and interactions in rhodopsin: Probing receptor activation by NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(5), 683–693.
- Rye, C., Wise, R., Jurukovski, V., DeSaix, J., Choi, J. & Avissar, Y. (2013). *Biology*.

Chapter 9 Cell communication. Houston, Texas: Openstax, Rice University.

- Scheerer, P., Park, J. H., Hildebrand, P. W., Kim, Y. J., Krauß, N., Choe, H.-W., Hofmann, K. P. & Ernst, O. P. (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, *455*(7212), 497–502.
- Schiöth, H. B. & Fredriksson, R. (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and Comparative Endocrinology*, *142*(1–2), 94–101.
- Shrestha, U. R., Perera, S. M. D. C., Bhowmik, D., Chawla, U., Mamontov, E., Brown, M. F. & Chu, X.-Q. (2016). Quasi-elastic Neutron Scattering Reveals Ligand-Induced Protein Dynamics of a G-Protein-Coupled Receptor. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, *7*(20), 4130–4136.
- Sugihara, M., Suwa, M. & Bondar, A.-N. (2014). Dynamics of bovine opsin bound to G-protein fragments. *Journal of Structural Biology*, *188*(1), 79–86.
- Valle Mendoza, L. J. del, Garriga Solé, P., Bosch Presegué, L., Ramon Portés, E., Götzens García, G. & Urtubia Vicario, C. (2002). Mecanismo de activación de la rodopsina: unión y activación de la proteína-G transducina. *Ver y Oír*, *19*(170), 723–727.
- Vicente, A. (2012). *Mecanismos reguladores implicados en la regulación entre receptores opioide mu-cannabinoide CB1 y glutamatérgico NMDA. Memoria para optar el grado de doctor.* Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Wu, E. L., Cheng, X., Jo, S., Rui, H., Song, K. C., Dávila-Contreras, E. M., Qi, Y., Lee, J., Monje-Galvan, V., Venable, R. M., Klauda, J. B. & Im, W. (2014). CHARMM-GUI *Membrane Builder* toward realistic biological membrane simulations. *Journal of Computational Chemistry*, *35*(27), 1997–2004.