

Trabajo Fin de Grado

Descubrimiento de inhibidores no competitivos del canal iónico TRPM8 sensible al frío

Autora

Magdalena Nikolaeva Koleva

Tutor

Dr. Gregorio Fernández Ballester

Departamento

Bioquímica y Biología Molecular

Área de conocimiento

Bioquímica y Biología Molecular

Titulación

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Resumen

El canal iónico Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) es un termocanal sensible a las bajas temperaturas, que se encuentra principalmente en neuronas sensoriales primarias de los ganglios trigéminos y dorsales. Se ha visto involucrado en hipersensibilidad al frío en contexto de dolor crónico al dañar los nervios periféricos o por el uso de fármacos quimioterapéuticos para tratar algunos tipos de cáncer. El objetivo principal de este trabajo es la búsqueda de antagonistas no competitivos del canal que podrían aliviar los síntomas de la neuropatía periférica. Para este fin se construyó un modelo del canal TRPM8 a partir del de otro miembro de la familia TRP, TRPV1 cuya estructura ha sido estudiada por crio-electromicroscopía de partícula única. El nuevo modelo de TRPM8 construido por homología se utilizó para realizar cribado virtual computacional enfocado hacia la búsqueda de sitios de unión para los ligandos, entre sitios ya conocidos como el del mentol o la icilina, además de los giros extracelulares. Los resultados obtenidos indican que un grupo de ligandos que comparten similitudes estructurales tiende a unirse a residuos del sitio de mentol, mientras que otro, a los giros extracelulares y al sitio de la icilina. Dicha preferencia podría explicarse por la diferente estructura química de los distintos ligandos y el entorno químico de los sitios de unión. A pesar de ello se necesitará un estudio posterior que profundice más en el comportamiento del canal tras la interacción con el efector.

The ionic channel Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) is a thermochannel sensible to low temperatures that is primarily localized on primary sensory neurons of the trigeminal and dorsal ganglia. It has been seen to be involved in hypersensitivity to cold in a chronic pain context during the harm of peripheral nerves or by the usage of chemotherapeutic drugs for the treatment of different types of cancer. The principal objective of this work is the search of non-competitive antagonists of the channel which might ease the symptoms of the peripheral neuropathy. In order to achieve it, a model of the TRPM8 channel was built from the model of another member of the TRP family, TRPV1, whose structure was studied by single-particle cryo-electromicroscopy (cryo-EM). The new model of TRPM8 built by homology was used to perform a computational virtual screening focused on the search of binding sites for the ligands, from sites already known, as the one of menthol, icilin or the extracellular loops. The obtained results indicate that a group of ligands that have structural similarities join to the menthol binding site, while others, to the extracellular loops or the icilin binding site. This preference can be explained due to the chemical structure of the different ligands and the chemical environment of the binding sites. Nevertheless, a more profound study is needed, which should center on the behavior of the channel after the interaction with the effector.

Palabras clave: TRPM8, neuropatía periférica, hipersensibilidad, cribado virtual computacional, antagonista.

1. Introducción

1.1. La familia de canales TRP

1.1.1 Generalidades

Los canales TRP (Transient Receptor Potential) son canales iónicos no selectivos a cationes que median el flujo de Ca^{2+} y Na^+ a través de la membrana celular. En las células excitables, la apertura de los canales TRP causa una despolarización en la membrana lo que facilita la generación de potenciales de acción. Por otra parte, en células no excitables causan la entrada masiva de Ca^{2+} que actúa como mensajero, activando distintas rutas de señalización intracelulares. Debido a la gran diversidad de mecanismos de apertura que presenta, esta familia de canales tiene un papel importante en la fisiología sensorial, incluyendo el gusto, visión, olfato, oído, tacto, nocicepción, osmo y termocepción.

Los canales TRP comparten homología de secuencia, lo que sirve para clasificarlos. Existen 7 subfamilias de canales TRP. Entre ellas están TRPA (Ankyrin) cuyo nombre se debe a las numerosas repeticiones de anquirina en el extremo N-terminal del canal, TRPP (Polycystin), también conocida como proteína de la enfermedad de los riñones poliquísticos. TRPML (Mucolipin) se relaciona con la mucopolisidosis tipo IV, enfermedad neurodegenerativa relacionada con el almacenamiento lisosomal. TRPN (No-mechano-potential C channel) está ausente en mamíferos y sólo aparece en un vertebrado, el pez cebra. TRPC (Canonical) fue el primer canal TRP encontrado en mamíferos. TRPV (Vanilloid) cuyo primer ligando encontrado fue la capsaicina, un compuesto vanilloide y finalmente, TRPM (Melastatin) que recibe el nombre del primer miembro encontrado de esta subfamilia, llamado melastatina.

En cuanto a la estructura de los canales TRP, estos presentan 6 segmentos transmembrana (S1-S6) con largas terminales N y C, intracelulares. La mayoría forman homotetrámeros que dan lugar a poros permeables a cationes. La activación de los canales TRP puede estar modulada por voltaje, ligandos, temperatura o estímulos mecánicos, aunque existen algunos que están constitutivamente activos. Además, existen canales TRP polimodales lo que significa que pueden ser activados por varios estímulos diferentes.

Las enfermedades relacionadas con los canales TRP son de dos tipos. Las canalopatías causadas por un mal funcionamiento del canal y las enfermedades en las que están involucrados dichos canales al ser la diana natural de toxinas o productos irritantes e inflamatorios. La desregulación de los canales TRP, tal como su desensibilización o cambios en el número de canales expresados, puede conllevar a estados patológicos. Las enfermedades causadas por una disfunción o desregulación hacen de los canales TRP dianas prometedoras para una modulación farmacológica.

1.1.2. Canales termoTRPs y termotransducción

Los canales iónicos termosensibles, presentes en las terminaciones nerviosas de las neuronas sensoriales periféricas que inervan la piel y las mucosas, son cruciales para la percepción de la temperatura. Los canales TRP sensibles a la temperatura tienen una gran dependencia hacia ésta y por eso reciben el nombre de termoTRPs. Entre estos canales se encuentran aquellos activados por el calor como algunos de la subfamilia

TRPV y TRPM, y otros activados por el frío, entre ellos TRPA1, TRPC5 y TRPM8. Entre todos, presentan un umbral de activación que va desde el frío más insoportable hasta el calor quemante.

Son las fibras periféricas aferentes de las neuronas sensoriales las que detectan los estímulos sensoriales por todo el cuerpo, y se encargan de transmitir la información recibida hasta el sistema nervioso central. Las aferentes sensoriales periféricas de los ganglios trigéminos inervan todos los tejidos de la cabeza y tienen la misma función. Las fibras aferentes periféricas forman tres grupos distintos basados en la velocidad de conducción de los estímulos. Las fibras A β con gruesas capas de mielina tienen una velocidad de conducción alta. Las fibras tipo I y II A δ con capas finas de mielina tienen una velocidad inferior. Finalmente, las fibras C sin mielina son las que presentan la velocidad más baja de conducción de los estímulos. La termocepción en mamíferos está mediada por las fibras A δ y C. Las C conducen los estímulos procedentes del calor moderado y el frío doloroso, mientras que las A δ , el frío moderado. Las A δ tipo I transmiten estímulos de calor doloroso.

1.1.3. Subfamilia de canales TRPM

La estructura de los canales TRPM se diferencia de algunas de las demás subfamilias TRP por el hecho de presentar en el extremo C-terminal una región altamente conservada de 23-25 aminoácidos que recibe el nombre de dominio TRP. Además, en el extremo N-terminal no presentan repeticiones múltiples de anquirina a diferencia de otras subfamilias.

Algunos miembros de la familia TRPM como TRPM4 y TRPM5 se caracterizan por ser impermeables al Ca²⁺, permeando sólo cationes monovalentes. Ambos miembros y además TRPM2 y TRPM3 se expresan en células beta pancreáticas productoras de insulina. La reducción de su expresión reduce la secreción de insulina inducida por glucosa. TRPM5 además participa en la transducción de las señales producidas por el sabor dulce, amargo y umami.

Finalmente, TRPM8 es un sensor de temperaturas en un rango de frescor cómodo hasta frío doloroso. Éste es el canal en el que se centra el presente trabajo y se desarrollará más ampliamente a continuación.

1.1.4. El canal TRPM8

En 1951 fueron descubiertas evidencias sobre un receptor de frío y mentol presente en neuronas, pero no fue hasta el 2001 cuando se clonó un gen que presentaba altos niveles de homología con proteínas TRP y a la proteína resultante de 1104 aminoácidos se le dio el nombre de TRPP8. Más tarde, en el 2002, se renombró como TRPM8.

Como otros miembros de la superfamilia TRP, TRPM8 está constituido por 4 subunidades, cada una de las cuales comprende 6 dominios transmembrana con un poro iónico entre S5 y S6. El C-terminal con 120 residuos es más corto comparado con otros miembros de la familia TRPM. Contiene dominios coiled-coil conservados que se piensa están involucrados en la tetramerización del canal. El C-terminal fue determinado como una parte esencial para el correcto funcionamiento del canal. En el C-terminal también está ubicado el dominio TRP, altamente conservado, que es responsable de los cambios conformacionales en el canal cuando se le une algún ligando. El dominio TRP además contiene sitios de unión para fosfolípidos de membrana, requeridos para la activación del canal.

El TRPM8 es un canal dependiente de voltaje, sin embargo, todavía no se conoce bien del todo la posición exacta del sensor de voltaje. Algunos autores sugieren que depende de la interacción entre S4 y S5, mientras que otros, entre S3 y S4.

El mecanismo de dependencia a la temperatura está regulado por el extremo C-terminal ya que fue observado que un cambio entre dichas regiones de los canales TRPM8 y TRPV1, cambia la dependencia a la temperatura en TRPM8, haciéndolo sensible al calor.

El dominio N-terminal contiene unos 700 aminoácidos y 4 regiones TRPM homólogas (MHR), presentes en todos los miembros de la subfamilia TRPM. La principal función del N-terminal es la correcta localización del canal en la membrana plasmática. Además algunos de sus residuos son fosforilados por la proteína quinasa A, regulando la actividad del canal. Los residuos de cisteína 929 y 940 forman un puente disulfuro y también son esenciales para la actividad del canal. Dicho puente flanquea el sitio de glicosilación del canal, encontrándose en el residuo Asn 934.

En general, la actividad de la mayoría de proteínas (enzimas, canales iónicos) aumenta con la temperatura, sin embargo en el caso de TRPM8 esto no sucede, activándose éste a temperaturas bajas. Para explicar este suceso se propuso un modelo de dos estados en los que el grado de cierre es más dependiente de la temperatura que el grado de apertura del canal. De esta forma, a temperaturas bajas, el grado de apertura permanece constante mientras que el de cierre disminuye, provocando la activación del canal. Además, la transición del estado cerrado al estado abierto es dependiente de voltaje, activándose el canal a potenciales más positivos. Este modelo es válido para temperaturas de 10°C a 45°C, que se pueden dar en condiciones fisiológicas. Sin embargo, este modelo no explica algunos resultados experimentales, y debido a ellos se propuso otro, un modelo alostérico. Según éste, los distintos dominios de la proteína actúan como sensores de voltaje, temperatura y agonistas, y modulan la apertura y cierre del canal. Este modelo es más complicado y tiene en cuenta mayor cantidad de variables.

El canal TRPM8 se encuentra principalmente en las neuronas sensoriales primarias, en concreto, una población de neuronas sensibles al frío, de pequeño y mediano diámetro en los ganglios trigéminos y dorsales. Las terminaciones periféricas de estas neuronas inervan la piel, lengua, paladar, dientes, córnea, colon y vejiga. TRPM8 se expresa en fibras C sin mielina y en fibras A δ recubiertas de finas capas de mielina. También se ha visto expresado en tejido broncopulmonar y tejido no nervioso, en la próstata, testículos, tracto urogenital, hígado, pulmones, la capa muscular vascular, espermatozoides y adipocitos blancos. Finalmente, TRPM8 fue encontrado en células tumorales neuroendocrinas y del melanoma.

En cuanto a la farmacología de TRPM8, éste se ha visto activado por distintos agonistas naturales como el mentol y el eucaliptol, alcoholes cíclicos monoterpenoides, y compuestos sintéticos como la icilina, geraniol, hidroxicitronelal, linalool y derivados sintéticos del mentol utilizados en la industria cosmética. Entre los antagonistas del canal se encuentran el BCTC o el bloqueador no específico de canales permeables al calcio, SKF96365, clotrimazol y econazol. Los agonistas provocan un desplazamiento en la dependencia al voltaje hacia potenciales más negativos, facilitando la apertura del canal en condiciones fisiológicas, mientras que los antagonistas, causan un desplazamiento hacia potenciales más positivos. En cuanto a los sitios de unión de los ligandos mencionados anteriormente cabe destacar que el residuo Tyr745 (S2) tiene un papel crucial para la

unión del mentol. Recientemente también se ha comprobado que los residuos cargados positivamente Arg842 y Lys856, que se encuentran en S4 y el bucle entre S4-S5, están implicados también en dicha unión y activación del canal (Voets et al., 2007). La principal interacción que estabiliza la unión entre el mentol y el residuo Tyr745 es un puente de hidrógeno formado con el grupo hidroxilo del ligando. Por otra parte, varios residuos apolares (Val742, Val743, Phe744, Ile746, Ala747, Phe748, Leu749, Leu750 en S2 y Leu806 en S3), están involucrados en contactos hidrofóbicos con el esqueleto de la molécula del mentol. La iclina por su parte, interacciona con los residuos Asn799, Glu802 y Gly805 (S3) aunque también con Tyr745.

El pH intracelular modula la actividad de TRPM8. Un aumento del pH intracelular acentúa la activación por frío e icilina, mientras que una disminución en el pH dificulta este hecho. Por otra parte, la activación inducida por mentol es independiente del pH en un rango de 6.5 hasta 8.

La N-glicosilación del residuo Asn934 facilita la segregación de TRPM8 en balsas lipídicas ricas en colesterol. La disminución de los niveles de colesterol estimula la activación del canal inducida por mentol y frío.

1.1.5. Papel fisiológico de TRPM8; analgesia y cáncer

Una de las principales funciones fisiológicas que recibe el canal TRPM8 es actuar como un sensor de frío. Indiscutiblemente el canal es un transductor del frío indoloro, sin embargo, cuando se quiso comprobar su función en la transducción del frío extremo y doloroso, los resultados no fueron tajantes. Algunos grupos obtuvieron resultados que indicaban este hecho mientras otros no. Finalmente se llegó a la conclusión de que el canal transmite los estímulos por frío extremo aunque existen otros canales iónicos que tienen la misma función y contribuyen a la sensibilidad hacia este rango de temperaturas. Algunos ejemplos de dichos canales son el TRPA1 y algunos canales de potasio.

En ratas y ratones se ha observado un papel termorregulador y de termo génesis del canal, para controlar y mantener la temperatura corporal. La activación del canal por agonistas como el mentol, el eucaliptol o la icilina, produce un aumento en la temperatura corporal, hecho que no se ha observado en animales TRPM8 knock-out. Por otra parte, los antagonistas del canal producen un descenso en la temperatura corporal en animales silvestres.

Otras funciones fisiológicas son la vasoconstricción y vasodilatación cuando el canal se expresa en el tejido muscular vascular. Además su presencia en el tracto urogenital, en los testículos o en el esperma sugiere un papel en la fertilidad masculina. En los pulmones TRPM8 puede causar una constricción de las vías respiratorias al inhalar aire frío. Por último, en la córnea controla el flujo lagrimal basal.

TRPM8 también está involucrado en la hipersensibilidad al frío en el contexto del dolor crónico causado por algún daño físico. Daño en los nervios periféricos puede causar dolor neuropático periférico, caracterizado por un incremento en la intensidad del dolor hacia estímulos ligeramente dolorosos (hiperalgesia) o estímulos indoloros (alodinia). En pacientes con trastornos en los nervios periféricos, el frío inocuo provoca sensaciones dolorosas. Un agente quimioterapéutico utilizado para tratar el cáncer colorectal, llamado oxaliplatino, causa hipersensibilidad hacia el frío lo que restringe las dosis y duración de los tratamientos. En ratones, una inyección de oxaliplatino o un daño constrictor crónico en el nervio ciático,

producen hipersensibilidad hacia el frío. Se ha observado que en ratones TRPM8 knock-out o tratados con capsazepina, un bloqueador inespecífico de TRPM8, o PBMC, antagonista de TRPM8, atenúan dicha hipersensibilidad.

Por otra parte, TRPM8 es el mediador principal de la hipersensibilidad hacia el frío inducida por inflamación. Esto se debe posiblemente a que TRPM8 es modulado por mediadores inflamatorios como fosfolípidos, protones y bradiquinina.

A pesar de todo ello, aplicaciones tópicas de mentol y ligeros enfriamientos focalizados se han utilizado para mejorar el dolor crónico de espalda, el dental, el postoperatorio, el dolor muscular y para la artritis. Esto sugiere que TRPM8 podría tener un papel importante en la analgesia. A pesar de que el mentol puede actuar sobre varias dianas moleculares una de las cuales son los receptores GABA, la analgesia que produce se ha comprobado que es a través de TRPM8.

El canal TRPM8 se ha encontrado en tejidos de cáncer de próstata y se ha convertido en una diana para la detección y tratamiento del cáncer. Recientemente se ha observado un aumento en los niveles de ARNm del canal, en sangre y orina de pacientes con cáncer de próstata en metástasis. TRPM8 se localiza en la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático de las células cancerosas de la próstata, donde probablemente regule los niveles de Ca^{2+} intracelular, necesarios para la viabilidad y proliferación de las células cancerosas. La inactivación de TRPM8 por medio de un ARN de interferencia, ha dado como resultado una disminución en el grado de proliferación de dichas células. Después del cáncer de próstata se han estudiado otros tipos de cáncer como el de mama, el neuroendocrino o el melanoma, en busca de TRPM8, y efectivamente se ha encontrado.

En resumen, TRPM8 resulta ser una diana terapéutica prometedora, al estar involucrado en multitud de estados patológicos y distintos tipos de cáncer. La búsqueda de moduladores eficaces permitiría tratar los problemas de salud relacionados, además de ayudar a entender mejor los mecanismos moleculares involucrados.

1.2. Modelado por homología

Dada la inexistencia de un modelo 3D del canal TRPM8 hasta el momento y dada la importancia de éste para realizar el presente trabajo, la primera tarea a llevar a cabo para seguir adelante fue modelar el canal por homología. Para ello se utilizó la estructura 3D existente del canal TRPV1 debido a la gran homología estructural entre ambos.

Uno de los mecanismos evolutivos es la duplicación de genes asociada a mutaciones, lo que conlleva a una divergencia y por tanto a la formación de familias de proteínas relacionadas, con secuencias aminoacídicas y estructuras 3D parecidas. Las proteínas que cumplen dichas premisas llevan el nombre de proteínas homólogas. En realidad, la secuencia de aminoácidos entre proteínas homólogas está menos conservada que la similitud estructural entre ellas. Esto se debe a que las diferencias más drásticas se encuentran en regiones de la superficie de la proteína, los denominados bucles. En estas regiones incluso las propiedades fisicoquímicas de las cadenas laterales pueden cambiar, sin embargo, en el interior de la proteína, los residuos varían con menor frecuencia. Esto conlleva a la generación de un núcleo común, con las estructuras secundarias

altamente conservadas entre las proteínas homólogas. Las estructuras secundarias de proteínas homólogas pueden cambiar de longitud o moverse en relación una hacia la otra, pero en general una hélice- α no se intercambia por una hoja- β , ni siquiera suele cambiar la orientación de ésta. Los aminoácidos involucrados en puentes salinos, enlaces de hidrógeno o puentes disulfuro es más probable que estén conservados también. En resumen, la conformación general de las proteínas homólogas está altamente conservada durante la evolución, hecho que forma la base del modelado por homología.

Si se tuviera que modelar una proteína cuya estructura se desconoce por completo y no se tiene ninguna referencia de cómo podría ser, se deberían buscar las secuencias aminoacídicas más parecidas, y modelarla según la estructura de alguna de las proteínas encontradas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que no todas las veces, la mejor opción, es la secuencia con mayor parecido, sino que tiene mayor importancia el parecido estructural. El proceso tradicional de modelado por homología comprende los siguientes pasos:

Búsqueda de proteínas relacionadas con la proteína estudiada.

En este caso la secuencia que debe ser modelada pertenece a una familia de proteínas bastante conocida. Sin embargo, para determinar qué miembro de las distintas subfamilias es conveniente utilizar para el modelado habría que basarse en una técnica central utilizada para comparar secuencias aminoacídicas denominada *alineamiento de secuencias*. Dicha técnica sirve para buscar en bases de datos para encontrar secuencias relativas y para identificar regiones en las proteínas encontradas que están conservadas, sugiriendo de este modo que la proteína estudiada presenta también partes estructuralmente conservadas. Si las secuencias son más largas de 100 aminoácidos y tienen una identidad mayor al 25% es muy probable que estén relacionadas. Si el grado de parecido está comprendido entre 15-25% entonces la probabilidad de relación disminuye pero sigue existiendo. Sin embargo, si el parecido está por debajo del 15%, es muy improbable que las proteínas estén relacionadas. Debido al paso crucial que representa el alineamiento de secuencias para el modelado por homología, han sido desarrollados varios métodos y distintos programas que siguen siendo perfeccionados. Uno de los primeros métodos fue el de Needleman y Wunsch cuya mayor ventaja es la garantía de la detección final del *mejor alineamiento global* entre dos secuencias. Por otra parte, otras aproximaciones buscan identificar el *mejor alineamiento local* y son importantes para la identificación de regiones altamente conservadas que están dispersas en secuencias largas.

Durante la comparación de dos secuencias, los procedimientos de alineamiento buscan duplicar el proceso evolutivo que participa en la conversión de una secuencia en otra. Para esta operación se requiere un esquema de puntuación que dicta el peso de alinear un aminoácido con otro, denominada matriz. Las puntuaciones de éstas se basan en propiedades físicas, químicas o estadísticas de los aminoácidos, donde las altas puntuaciones indican que una determinada sustitución es probable.

Hay que tener en cuenta que los alineamientos automáticos están lejos de la perfección y por eso deben ser siempre comprobados para ver si son razonables. En dichas comprobaciones debe incorporarse toda la información sobre los distintos grados de organización de las proteínas (primario, secundario y terciario).

Identificación y construcción de regiones estructuralmente conservadas (SCRs)

Existen regiones en las proteínas que pertenecen a una misma familia, que son casi idénticas en sus estructuras 3D. Son las así denominadas regiones estructuralmente conservadas (SCRs) que se corresponden con las estructuras secundarias hélices- α y hojas- β , que permiten la asignación de las coordenadas atómicas desde una proteína a otra que se pretende modelar.

Si se dispone de varias estructuras cristalográficas para asignar la estructura de una proteína de interés, se pueden superponer las estructuras 3D de las proteínas molde en busca de SCRs. Esta superposición es más complicada porque a priori se desconocen las partes que deberían encajar perfectamente y por tanto, hay que decidir qué átomos elegir para efectuar la superposición. Normalmente se utilizan los C_{α} y después, la superposición inicial se optimiza utilizando elementos estructurales secundarios. Hay que tener en cuenta que las estructuras secundarias deben asignarse antes de la búsqueda de SCRs. La forma más fácil para obtener información acerca de la estructura secundaria es a partir de los archivos cristalográficos, como los PDB. Además, existen programas para detectar elementos estructurales secundarios en base a características geométricas como el patrón de enlaces de hidrógeno o los ángulos diedros del esqueleto peptídico. Finalmente, las SCRs determinadas deben tener secuencias idénticas o muy parecidas. Debido a la similitud estructural de estas regiones, no se permiten huecos en las zonas conservadas.

Construcción de las regiones estructuralmente variables (SVRs)

Dichas regiones se corresponden sobre todo con los bucles superficiales, cuya construcción es un reto. Dependiendo del caso se deberá seguir un método u otro. Una forma de conseguir modelar los giros es basarse en un segmento de tamaño equivalente de una proteína homóloga. Distintos estudios han demostrado que en proteínas homólogas donde los giros de las regiones variables tengan la misma longitud y el mismo carácter aminoacídico, tienen la misma conformación, permitiendo la transferencia de coordenadas atómicas de la misma forma que para las SCRs.

Si no existen giros comparables, las SVRs se pueden construir a partir de segmentos peptídicos de otras proteínas que encajan adecuadamente en la configuración espacial de la proteína modelada y por tanto cumplen con unos criterios geométricos determinados. Este método recibe el nombre de *búsqueda de bucles* y basándose en las distancias y coordenadas de referencia que le son proporcionadas, da como resultado varios giros puntuados según lo bien que encajan en la estructura deseada. Este método tiene la ventaja de que todos los bucles proporcionados tienen una geometría razonable, sin embargo no garantiza que el segmento elegido encaje perfectamente en la estructura ya modelada de la proteína de interés, de forma que se pueden detectar solapamientos estéricos importantes. Si esto sucede, la técnica de generación *de novo* es la mejor opción.

Con esta aproximación se construye el esqueleto peptídico entre dos segmentos conservados utilizando valores aleatorios para todos los ángulos diedros del esqueleto. Existen varios algoritmos para optimizar la estrategia de búsqueda y minimizar el tiempo de cálculo. A pesar de ello, esta técnica se utiliza solo para giros formados por hasta 7 aminoácidos.

Todos los giros generados por un método u otro, están lejos de la perfección, por lo que es conveniente realizar un refinamiento por medio de minimizaciones de energía que relaje las conformaciones de los giros y elimine los choques estéricos.

Modelado de las cadenas laterales

La predicción de las numerosas conformaciones de las cadenas laterales es un problema mucho más complejo que la predicción de la conformación del esqueleto peptídico. Muchas de las cadenas laterales poseen varios grados de libertad y por tanto pueden adoptar varias conformaciones energéticamente permitidas. Se asume generalmente que residuos idénticos entre proteínas homólogas adoptan conformaciones similares. También cadenas de residuos de una misma pareja (Val e Ile o Gln y Glu) adoptan una misma orientación. Sin embargo, cuando los aminoácidos entre las proteínas homólogas no coinciden y en la proteína que se quiere modelar, la cadena lateral es más larga que la del aminoácido correspondiente de la proteína molde, la cadena lateral deberá adoptar una posición aleatoria que evite contactos indeseados con otras cadenas laterales. Existen librerías de rotámeros construidas a partir de las combinaciones de las posiciones anti- y *gauche* de cada cadena lateral. Seleccionar una conformación a partir de la librería puede resultar problemática ya que no se tendrá en cuenta la conformación de la cadena lateral del aminoácido correspondiente en la proteína homóloga, ni el entorno local al que se enfrenta la cadena lateral.

Por otra parte, las posiciones de las cadenas laterales deberán refinarse manualmente en casos especiales cuando el aminoácido forma interacciones específicas como puentes disulfuro, puentes de hidrógeno internos o puentes iónicos. También, cuando el aminoácido se encuentra en la superficie y es totalmente accesible al medio. Igualmente, es conveniente utilizar la dinámica molecular para explorar la región local del espacio conformacional y refinar la estructura.

1.3. Dinámica molecular

Los modelos proteicos derivados a partir de modelado por homología necesitan un posterior refinamiento de la estructura tridimensional. En general, las cadenas laterales y los giros proteicos generados durante el modelado adoptan unas conformaciones que no se corresponden con estructuras razonables energéticamente. Debido a la gran cantidad de átomos que supone una proteína, la única forma de conseguir dicho refinamiento es mediante cálculos de dinámica molecular. Este método se basa en las implicaciones de la Mecánica Molecular donde los electrones y el núcleo de los átomos no se incluyen explícitamente. La Mecánica Molecular a diferencia de la Mecánica Cuántica, considera que la composición atómica de las moléculas es una colección de masas interactuando entre sí por medio de fuerzas armónicas. Los átomos se toman como esferas de diferentes tamaños unidas entre sí por muelles de distinta longitud. Para calcular la energía potencial del conjunto de átomos se utiliza la ley de Hooke.

$$F = -k\delta,$$

donde F es la fuerza ejercida en el muelle con el alargamiento δ producido y k es la constante elástica.

El objetivo principal de la dinámica molecular es reproducir el movimiento de una molécula, dependiendo del tiempo. A intervalos regulares de tiempo, se resuelve la ecuación de la segunda ley de Newton:

$$F_i(t) = m_i a_i(t),$$

donde F_i es la fuerza ejercida sobre el átomo i a tiempo t , m_i es la masa del átomo i y a_i es la aceleración del átomo i a tiempo t .

En base a las coordenadas atómicas iniciales del sistema se pueden calcular nuevas posiciones y velocidades para los átomos a tiempo t . Como resultado de este procedimiento se crea una nueva conformación. La dinámica molecular es capaz de superar barreras de energía entre las diferentes conformaciones de una molécula. De esta forma sería capaz de encontrar otros mínimos locales que se encuentran en la superficie de energía potencial. A pesar de ello, si las barreras energéticas son demasiado grandes o si existen muchos grados de libertad para la molécula, algunos de los conformeros existentes no se podrían alcanzar. Un punto importante en todos los protocolos de dinámica molecular es la elección de la temperatura de simulación. Normalmente, las simulaciones se realizan a temperaturas comprendidas entre 300 y 400 K. Por una parte, la temperatura debe ser suficientemente elevada como para evitar que el sistema se quede atrapado en una región particular del espacio conformacional, pero por otra, no debe ser demasiado elevada para no resultar en conformaciones distorsionadas de elevada energía. Otro problema que causa la elevada temperatura en las simulaciones de péptidos y proteínas, es la interconversión de enlaces peptídicos del estado *trans* al *cis*.

En muchos casos, el algoritmo del descenso más pronunciado (*steepest descent*) es el primero en utilizarse. Este método utiliza la primera derivada de la función de energía para aproximarse al mínimo energético. La energía se calcula para la geometría inicial y para las nuevas geometrías que se generan cuando alguno de los átomos se mueve en alguna dirección. El proceso se repite para todos los átomos resultando en un posicionamiento cuesta abajo en la superficie de energía potencial. El proceso de optimización se hace más lento cuanto más se aproxima al mínimo global, por lo que este método se utiliza para estructuras que se encuentran lejos de dicho mínimo.

Se considera que los átomos de la molécula interactúan entre sí según las reglas del campo de fuerza utilizado. Éstos se basan en las ecuaciones de energía potencial. Los campos de fuerzas utilizados para proteínas o macromoléculas en general, presentan simplificaciones como incluir los átomos de hidrógeno apolares en las descripciones de los átomos pesados a los que están unidos, en vez de representarlos explícitamente. También se introducen radios de corte para reducir el tiempo de cálculo de las interacciones débiles entre átomos separados por distancias mayores al límite fijado. Debe tenerse en cuenta que cada simplificación añadida puede resultar en una pérdida de exactitud en el resultado obtenido. Para conseguir una mayor reducción en el tiempo de cálculo, diversas partes de la proteína pueden mantenerse rígidas, llevando a cabo entonces las simulaciones de dinámica molecular solo para las partes flexibles como cadenas laterales o giros.

El campo de fuerza utilizado para las simulaciones de dinámica molecular para el canal TRPM8 fue YASARA2 implementado en el programa YASARA (<http://www.yasara.org>). Éste ha sido optimizado para

predicción de estructuras, refinamiento, minimización de energía y validación, y se utiliza sobre todo para refinamiento de estructuras obtenidas por modelado por homología. Contiene potenciales diedros y potenciales de interacción basados en el conocimiento que dan resultados más precisos de los modelos proteicos refinados, en comparación con otros campos de fuerza.

1.4. Cribado virtual

El cribado de alto rendimiento (HTS) de librerías químicas es un método bien establecido para encontrar nuevos compuestos líderes durante el descubrimiento de fármacos. A pesar de ello, debido a que las librerías de compuestos aumentan cada vez más su tamaño, los costes de cribado se ven incrementados, mientras que el nivel de acierto disminuye. Este problema se podría solucionar si, en vez de cribar experimentalmente toda la librería, sólo se cribase una parte pequeña de compuestos propensos a unirse al receptor. Esta preselección podría realizarse mediante cribado virtual (VS), un método computacional utilizado en la selección de los compuestos más prometedores de una librería química. Para limitar el número de compuestos a cribar se pueden utilizar distintos filtros, uno de los cuales es la Regla del 5 de Lipinski. A pesar de que en el caso de este trabajo el número de compuestos a cribar es limitado, se comprobó que todos ellos cumplieran con dicha regla ya que de lo contrario podrían presentar una baja absorción o permeabilidad en los ensayos experimentales, y no ser unos buenos candidatos farmacológicos.

Los trabajos de cribado pueden ser rígidos, semiflexibles o flexibles y realizarse considerando al receptor y al ligando como moléculas rígidas, al receptor como rígido y a los ligandos como flexibles o a ambos elementos como flexibles, respectivamente. También, en el cribado semiflexible se puede tratar a unas pocas cadenas laterales del receptor como flexibles y mantener el resto de la estructura rígida. Debido a que las proteínas son moléculas altamente flexibles, a la hora de realizar el cribado virtual, lo mejor sería tratar al receptor como flexible. Sin embargo, dada la gran carga computacional que implicaría, requeriría de ordenadores más potentes, con mayor capacidad de disco duro, RAM y procesador. Por tanto, para agilizar el trabajo, podría elegirse una de las siguientes dos opciones: a) considerar el receptor totalmente rígido y al ligando totalmente flexible, ya que los ligandos son moléculas mucho más pequeñas y su flexibilidad es más fácil de considerar, o b) considerar el receptor semiflexible dando libertad de movimiento a algunas cadenas laterales, y el ligando totalmente flexible. En este segundo caso es necesario conocer el sitio de unión del ligando.

Para el presente trabajo de cribado virtual se tienen datos estructurales de la proteína diana, así como, se conocen varias moléculas activas que se unen a ella para modularla. El método más idóneo a utilizar, es el de acoplamiento proteína-ligando o cribado virtual basado en estructura, donde se busca la complementariedad electrónica y estérica entre los ligandos y la diana macromolecular. A pesar de que se conocen varios sitios de unión de moléculas moduladoras del canal, el cribado realizado es global, es decir, sin determinar un bolsillo de unión específico donde se tengan que acoplar los ligandos. El programa YASARA permite mantener el ligando completamente rígido o darle flexibilidad. También permite mantener flexibles distintas partes de la proteína diana, especificando los residuos correspondientes. Los parámetros “*rigid*” y “*flexres*” que corresponden al

control de la flexibilidad del ligando y la proteína, respectivamente, se mantuvieron con los valores predeterminados, es decir, el cribado se realizó con los ligando flexibles y la proteína completamente rígida.

Es necesario evaluar y clasificar los distintos acoplamientos ligando-proteína para identificar el modo de unión más probable y asignarle una prioridad. La evaluación se realiza asignando a cada ligando una puntuación proveniente de funciones relacionadas con la energía libre de asociación entre las dos moléculas (proteína-ligando). La energía libre de unión proviene de la ecuación de Gibbs – Helmholtz:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S,$$

donde ΔG es la energía libre de unión, ΔH es la entalpía, T es la temperatura en grados Kelvin y ΔS , la entropía. ΔG se relaciona con la constante de unión K_i por la ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K_i,$$

donde R es la constante de los gases.

Existe una gran variedad de técnicas distintas para predecir la energía libre de unión de pequeñas moléculas en base a una estructura 3D dada. Estas técnicas se diferencian significativamente en cuanto a velocidad y precisión. Si lo que se quiere predecir es la diferencia de energía libre de unión entre un ligando y una molécula de referencia, de forma muy precisa aunque muy lenta, se recomienda el uso de las perturbaciones de energía libre. Si por otra parte, el objetivo principal es comparar las energías libres de unión de varios cientos de complejos ligando-proteína, con mucha mayor rapidez, se deben utilizar funciones de puntuación de menor precisión. Las funciones de puntuación se pueden dividir en tres grupos: funciones de puntuación empíricas, funciones basadas en el campo de fuerza y potenciales basados en conocimiento. En el cribado virtual, las funciones de puntuación se utilizan con dos propósitos: durante el proceso de cribado sirven para optimizar el posicionamiento del ligando, mientras que después de completar el cribado, se utilizan para clasificar a los ligandos como ya se mencionó anteriormente.

El campo de fuerza utilizado por YASARA para llevar a cabo los trabajos de cribado virtual es el AMBER03 (Duan Y *et al.*, 2003), que ha sido desarrollado para usos generales en cualquier tipo de aplicación. La función de puntuación utilizada en este caso se basa en el potencial de Lenard-Jones que describe las interacciones van der Waals y en la energía de Coulomb que describe los componentes electrostáticos de la interacción. La función de energía tiene la siguiente forma:

$$E = \sum_{i=1}^{lig} \sum_{j=1}^{rec} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + 332 \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \right]$$

donde A_{ij} y B_{ij} son los parámetros de repulsión y atracción de van der Waals entre los átomos i y j a una distancia r_{ij} , q_i y q_j son las cargas puntuales de los átomos i y j , D es la constante dieléctrica y 332 es una factor que convierte la energía electrostática en kilocalorías por mol. La mayor desventaja de esta función de energía es la omisión del componente entrópico de la energía libre de unión.

2. Antecedentes y objetivos

2.1. Antecedentes

Se ha observado que varios fármacos utilizados en quimioterapia para tratar distintos tipos de cáncer, causan efectos secundarios como la neuropatía periférica, agravada por el frío, que limita la dosis utilizada y compromete seriamente la eficacia de los tratamientos. Un ejemplo de dichos fármacos es el oxaliplatino, utilizado en el tratamiento del cáncer de páncreas y el cáncer colorrectal.

Dado el papel primordial que recibe el canal TRPM8 en la sensibilización hacia el frío, se piensa que un inhibidor de dicho canal iónico podría aliviar los síntomas. Sin embargo, la búsqueda debe centrarse en antagonistas no competitivos o en bloqueadores de canal abierto, ya que los antagonistas competitivos podrían producir efectos secundarios indeseados.

La existencia de un modelo estructural del canal iónico TRPV1 de Liao M. *et al.*, 2013, ha permitido crear un modelo por homología del canal TRPM8 que facilitará la búsqueda de moduladores específicos de dicho canal iónico.

2.2. Objetivos

2.2.1. Generales

Desarrollo de nuevos moduladores TRPM8 basados en el conocimiento detallado de la estructura y la actividad del canal TRPM8.

2.2.2. Específicos

- Modelado de TRPM8 en estado abierto, con modificación de los bucles extracelulares, análisis de la estructura y minimización de la energía por dinámica molecular.
- Definición de una librería de compuestos orgánicos que serán chequeados frente al modelo TRPM8 mediante cribado virtual computacional basado en estructura.
- Descubrimiento de antagonistas no competitivos de TRPM8 capaces de unirse específicamente al estado abierto del canal, lo que permitirá bloquear preferentemente receptores muy activados, frente a canales poco activos o silentes.

3. Materiales y métodos

3.1. Modelado por homología de TRPM8 a partir de TRPV1.

Tener un modelo fiable del canal TRPM8 representa un paso fundamental en la búsqueda de moduladores de su actividad. A pesar de que existan modelos de TRPM8 a partir de canales de potasio (K_v) cuya estructura ha sido determinada por cristalografía de rayos-X, no se sabe hasta qué punto la familia TRP comparte similitudes estructurales con estos. Dado que la obtención de cristales de proteínas de membrana de mamíferos constituye un reto, sobre todo para canales TRP que responden a diversos estímulos y son por tanto altamente dinámicos, recientemente se ha optado por el uso de la crio-electromicroscopía de partícula única (cryo-EM) para la reconstrucción tridimensional de grandes complejos proteicos con resolución casi atómica.

Dicha técnica ha sido utilizada para la determinación de la estructura del canal TRPV1 en los estados abierto y cerrado, llegando a una resolución de 3.8 Å y 3.4 Å, respectivamente (Liao M. *et al.*, 2013; Cao E. *et al.*, 2013). Al pertenecer a la misma familia de canales iónicos, se esperaría que TRPV1 y TRPM8 tuviesen mayor parecido estructural entre sí que TRPM8 y los canales de potasio. Es por eso que TRPM8 fue modelado a partir de TRPV1, en los estados abierto y cerrado.

3.2. Construcción de giros extracelulares del estado abierto del canal TRPM8

Debido a que el modelo inicial del canal en estado abierto presentaba unos giros extracelulares incorrectos, tal y como se puede observar en la Figura 1, éstos fueron reemplazados por los giros del canal en estado cerrado donde ya habían sido conseguidos anteriormente. Para dicho fin se utilizó el programa YASARA (<http://www.yasara.org>) debido a las posibilidades que ofrece para el reemplazo de dominios de proteínas. Antes de todo, se alinearon estructuralmente los modelos de los dos estados del canal, por el método MUSTANG (Konagurthu AS *et al.*, 2006), que utiliza un algoritmo para alineamiento estructural múltiple utilizado para proteínas (*Analyze>Align>Objects with MUSTANG*), para visualizar los mejores puntos de solapamiento entre sus giros (Figura 2), intentando a la vez conservar su total integridad. Se determinó que los mejores puntos de corte en cada una de las subunidades del canal serían Phe 712, Ser 733, Leu 889 y Pro 958. De esta forma, el reemplazo realizado fue entre los segmentos Phe 712 – Ser 733 y Leu 889 – Pro 958 de cada subunidad, del estado abierto por el del estado cerrado. Para lograrlo se siguieron los pasos siguientes:

- Eliminar las partes de la proteína en cada estado que no interesan (*Edit>Delete>Residue* y *seleccionar los residuos que se quieran eliminar*). En este caso, los giros extracelulares del estado abierto y el canal completo excepto los giros del estado cerrado.
- Crear puntos de corte en la proteína en estado abierto para poder insertar los segmentos anteriormente mencionados de la proteína en estado cerrado (*Edit>Split>Residue* y *seleccionar el residuo donde se quiera realizar el corte*). A continuación se debe dividir el objeto principal en objetos hijos para poder unir al final todos los objetos en uno (*En la ventana de "Scene Content", botón derecho sobre el objeto principal y seleccionar Split*).
- Unir los distintos segmentos utilizando el comando *JoinObj X, Y* (se une el objeto X al Y, quedando el X vacío; se debe tener en cuenta la secuencia numérica de los residuos de cada segmento).
- Finalmente se deben crear los enlaces peptídicos correspondientes en cada corte. Para ello se utiliza el comando *AddBond Z, W, 1*. Z y W se corresponden con el número concreto de cada átomo de carbono y nitrógeno entre los que se quiera crear el enlace. 1 se corresponde con el tipo de enlace que se quiera crear, siendo en este caso, un enlace simple.

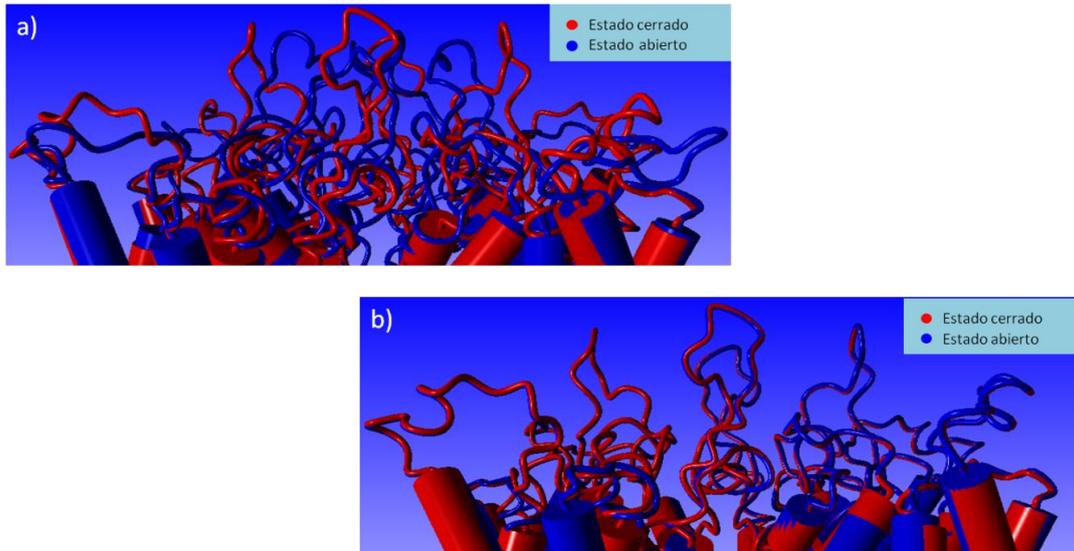


Figura 1. Los bucles del estado cerrado (rojo) ya habían sido corregidos previamente, y se había creado un puente disulfuro entre C929 y C940. Dado que el modelo abierto presentó bucles incorrectos a), se procedió a trasplantar dichos bucles desde el estado cerrado al abierto, obteniendo un modelo abierto corregido b).

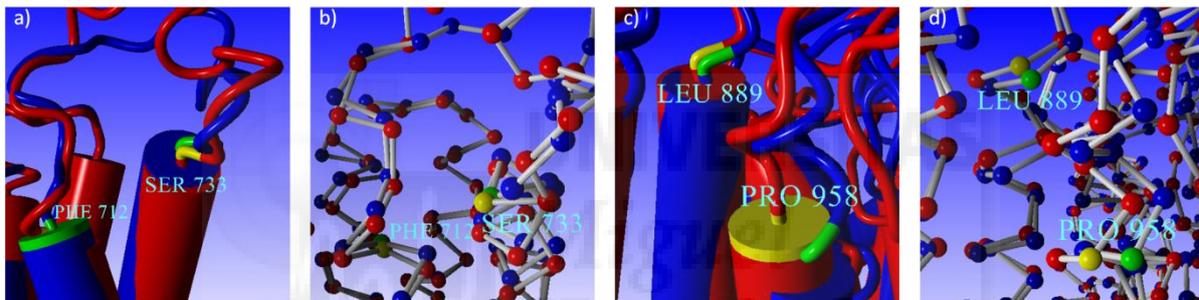


Figura 2. Se ilustran los aminoácidos considerados en ser los mejores puntos de corte para la inserción de los bucles desde el modelo cerrado hasta el abierto. A pesar de que en algunos casos, el aminoácido proveniente de la proteína en estado cerrado adopta una estructura secundaria distinta, la estructura del canal en estado abierto con los nuevos bucles se ha mantenido igual que la original.

3.3. Análisis del nuevo modelo del canal en estado abierto

Con el fin de comprobar la existencia de cualquier error que se haya podido producir durante la construcción de los giros correctos del canal en estado abierto, tanto en cuanto a deleciones como a duplicaciones de cualquier aminoácido, se buscó la secuencia de aminoácidos del canal TRPM8 de rata en la base de datos *UniProt* y se realizó un alineamiento mediante el programa *ClustalW* entre dicha secuencia y la secuencia del canal en estado abierto extraída mediante el programa *SPDBV*, en formato fasta. Tal y como se puede observar en el Anexo 1, no hubo ninguna mutación en la secuencia del canal en estado abierto.

Además, para validar estructuralmente el nuevo modelo del canal en estado abierto, se llevó a cabo un análisis mediante el programa YASARA (*Analyze>Check>All>Elegir parámetro*) que muestra como resultado un valor de Z, que clasifica el modelo en bueno o malo según la escala de la Tabla 1. Los parámetros

Z-score	Description
< -5	disgusting
< -4	terrible
< -3	bad
< -2	poor
< -1	satisfactory
< 0	good
> 0	optimal

Tabla 1. Escala de valores Z y su significado.

analizados fueron la exactitud de los estereoisómeros o la presencia de D-aminoácidos en la proteína (Isomers), la presencia de enlaces peptídicos en cis (PepBonds), y la normalidad de la longitud de los enlaces (Bonds), de

los ángulos de los enlaces (*Angles*), de los ángulos diedros (*Dihedrals*), de la planaridad de los ángulos diedros (*Planarity*), de las interacciones de Coulomb y Van der Waals (*NonBonded*), de las interacciones de empaquetamiento dependientes de distancia unidimensional en el campo de fuerza YASARA2 (*Packing1D*), de las interacciones de empaquetamiento dependientes de distancia tridimensional en el campo de fuerza YASARA2 (*Packing3D*) y finalmente la calidad global del modelo (*ModelQuality*) determinada por tres de los parámetros anteriores (*Dihedrals*, *Packing1D* y *Packing3D*). Hay que tener en consideración que los valores de Z se obtienen comparando la estructura de la proteína con un estándar de referencias estructurales. Dichas referencias no son proteínas de membrana y en general los valores de Z obtenidos de esta forma son muy bajos. Sin embargo, esto no significa que el modelo de la proteína de interés sea incorrecto.

El análisis se realizó dos veces, la primera antes de llevar a cabo la minimización de energía por dinámica molecular y la segunda, después. La forma de efectuar dicha minimización se explicará en el siguiente subapartado. En la siguiente tabla se muestran los distintos valores de Z obtenidos para cada parámetro, en las dos fases mencionadas anteriormente.

Parámetro analizado	Antes de la minimización de energía	Después de la minimización de energía
*Estereoisómeros (<i>Isomers</i>)	8	0
*Enlaces peptídicos (<i>PepBonds</i>)	16	16
Longitud de enlace (<i>Bonds</i>)	-1.725	-1.020
Ángulos de enlace (<i>Angles</i>)	-0.371	0.031
Ángulos diedros (<i>Dihedrals</i>)	-2.356	-2.183
Planaridad (<i>Planarity</i>)	-1.119	-0.635
Interacciones débiles (<i>NonBonded</i>)	-146.531	-0.748
(<i>Packing1D</i>)	-3.253	-2.929
(<i>Packing3D</i>)	-3.788	-3.693
Calidad global (<i>ModelQuality</i>)	-3.372	-3.176

Tabla 2. Resultados de la calidad estructural del estado abierto antes y después de la minimización de energía. Los dos parámetros que aparecen con el símbolo (*) no siguen la escala de valores Z anterior, sino que cuanto más se acercan a cero, mayor es la calidad de modelo ya que no deben haber D-aminoácidos, y la presencia de enlaces *cis* es condicional y dependiente de la estructura secundaria donde se encuentran.

Por medio del análisis se encontraron 8 D-aminoácidos, que fueron HIS 928 y CYS 929 en las cuatro subunidades. Utilizando YASARA, éstos se cambiaron a L-aminoácidos mediante la opción *Swap>Residue* haciendo clic con el botón derecho sobre el aminoácido que se quiera cambiar. Se tuvo en cuenta que el residuo CYS 929 forma un puente disulfuro con el residuo CYS 940, y que al cambiar su configuración, este puente probablemente se romperá. Debido a este hecho se volvió a reconstruir. Para hacerlo se mutaron los residuos de cisteína que participan en la formación del enlace (*Botón derecho sobre el residuo>Swap>Cyx*) y se creó el enlace sencillo entre los dos residuos (*Seleccionar ambos residuos>Botón derecho>Add>Bond>Single*). Finalmente, por dinámica molecular se relajaron los nuevos enlaces formados.

En cuanto a los enlaces peptídicos *cis*, se encontraron 16, 8 de los cuales pertenecían a residuos de prolina, PRO 764 y PRO 938 en las cuatro subunidades, por lo que no hizo falta cambiarlos. Por otra parte, los 8

enlaces restantes se encontraron en residuos no-prolina, ASP 920 y GLU 942 en las cuatro subunidades. Debido a que la configuración del enlace peptídico es dependiente de la estructura secundaria que adoptan los residuos entre los que se forma, al pertenecer ASP 920 y GLU 942 a una estructura secundaria con mayores grados de libertad, como son los giros, tampoco hizo falta cambiarlos, ya que no desestabilizan la estructura.

Tal y como se puede observar en la Tabla 2., la minimización de energía en el modelo ha mejorado el valor de Z en la totalidad de los parámetros, sobretodo en el caso de las interacciones débiles, debido a la disminución de los choques estéricos entre los distintos elementos.

3.4. Minimización de energía mediante dinámica molecular

La minimización de energía por dinámica molecular se hizo con los modelos de ambos estados del canal, el abierto y el cerrado y para ello, se utilizó el programa YASARA. Para ejecutar la simulación se debe elegir un campo de fuerza, en este caso YASARA2 (*Simulation>Force Field>YASARA2>Cutoff=7,89 Å>Set these two parameters instead*), fijar una celdilla de simulación alrededor de la proteína completa (*Simulation>Define simulation cell>Extend 5,0 Å around all atoms*), fijar la parte de la proteína que no debe moverse durante la simulación, que en este caso es el esqueleto peptídico de la proteína excepto el de los giros extracelulares. Para ello, en la consola se escribe *FixAtom backbone Mol X* (donde X es el nombre que recibe la molécula en YASARA), fijando todo el esqueleto peptídico sin las cadenas laterales y *FreeRes Z-Y Mol X* (donde Z-Y corresponde al intervalo de residuos que se quieren liberar, en este caso los giros extracelulares 712-733 y 889-958). Finalmente se debe controlar la temperatura de simulación (*Simulation>Temperature control>Steepest descent minimization*). El control de temperatura se puede efectuar también directamente desde el panel de "Simulation Parameters", que se muestra al presionar "Ctrl + Insert". El control se realiza con la tecla F10. Al ver que la simulación bajo este control de temperatura no efectuaba muchos cambios en la estructura de la proteína, se decidió, realizarla bajo el control de temperatura "Step-10 annealing" donde el cambio de temperatura es más pronunciado. Para iniciar la simulación se debe presionar F12 y dejarla durante unos 1000 fs. Hay que tener en cuenta que cuanto más extrema es la temperatura de la simulación, los cambios en la estructura se producen con mayor rapidez.

3.5. Librería de compuestos – construcción y análisis

A partir de la lista de ligandos seleccionada al principio del presente trabajo debido a la similitud estructural de los compuestos con la serotonina y la melatonina que tienen efecto sobre distintos receptores celulares, se comprobaron todos los archivos .sdf para ver la coincidencia en la estructura con la presente en la base de datos PubChem. Cualquier cambio estructural en los ligandos se efectuó con el programa Marvin Sketch (<https://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/>). Después se analizaron las características físico-químicas de los ligandos con el programa Marvin View. Los parámetros analizados fueron el peso molecular (*Tools>Elemental analysis*), el número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno (*Tools>Other>H Bond Donor/Acceptor*), el punto isoeléctrico (*Tools>Protonation>Isoelectric Point*), el coeficiente de partición octanol-agua (logP) (*Tools>Partitioning>LogP*) y la polarizabilidad de la molécula (*Tools>Charge>Polarizability*). Además para obtener el nombre exacto según la IUPAC, se utilizó la opción

Tools>Naming. Los parámetros anteriores fueron analizados para comprobar si cada molécula cumple con las reglas de Lipinski importantes durante la búsqueda de nuevos fármacos. Según dicha regla, el peso molecular debe ser menor de 500 Da, los donadores de puentes de hidrógeno deben ser menos de 5, los aceptores de puentes de hidrógeno deben ser menos de 10 y el coeficiente de partición octanol-agua (logP) que determina la hidrofobicidad de la molécula debe ser menor de 5.

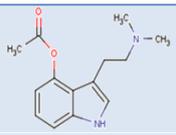
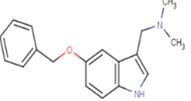
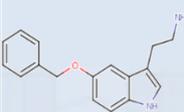
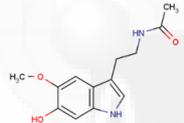
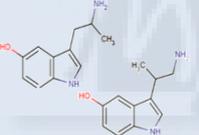
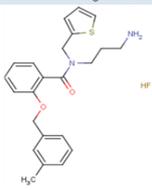
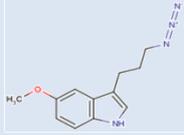
Nombre común/ base de datos	Estructura química	Nombre IUPAC	Peso molecular (Da)	Donadores de puentes de hidrógeno	Aceptores de puentes de hidrógeno	Punto isoelectrónico	LogP
4-acetoxyDMT		3-[2-(dimethylamino)ethyl]-1H-indol-4-yl acetate	282.766	2	2	13.29	1.91
5-bencyloxygramine		N,N-dimethyl-1-(5-phenylmethoxy-1H-indol-3-yl)methanamine	280.364	2	2	12.76	3.58
5-bencyloxytryptamine		2-(5-phenylmethoxy-1H-indol-3-yl)ethanamine	266.338	4	2	13.59	3.05
6-hidroxy melatonin		N-[2-(6-hydroxy-5-methoxy-1H-indole-3-yl)ethyl]" data-bbox="255 455 370 510"/>	248.278	3	6	4.17	0.84
Alpha-metylserotonin		3-(2-aminopropyl)-1H-indol-5-ol	190.242	5	2	9.85	1.60
AMTB		N-(3-aminopropyl)-2-[(3-methylphenyl)methoxy]-N-(thiophen-2-ylmethyl)benzamide hydrofluoride	394.530	3	4	-	4.25
CHEMBL236265		3-(3-azidopropyl)-5-methoxy-1H-indole	230.266	1	5	6.39	2.70

Tabla 3. Recoge a los compuestos elegidos para realizar el cribado virtual computacional. Las características detalladas de cada uno son el nombre común o en caso de no existir, el nombre que recibe en la base de datos, su nomenclatura según la IUPAC, el peso molecular en Daltons, el número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, el punto isoelectrónico y el coeficiente de partición octanol-agua (LogP).

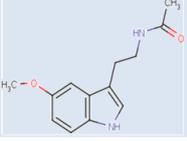
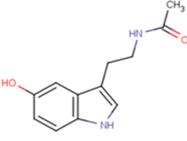
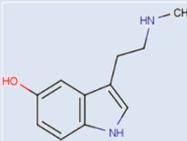
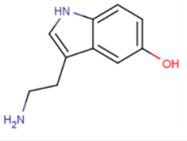
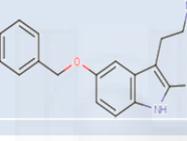
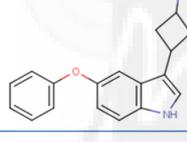
Nombre común/ base de datos	Estructura química	Nombre IUPAC	Peso molecular (Da)	Donadores de puentes de hidrógeno	Aceptores de puentes de hidrógeno	Punto isoeléctrico	LogP
Melatonin		N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamide	232.278	2	4	7.40	1.15
N-acethyl-5-hydroxytriptamine		N-[2-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamide	218.252	3	4	4.31	1.00
N-methylserotonin		3-[2-(methylamino)ethyl]-1H-indol-5-ol	190.242	4	2	9.95	1.62
Serotonin		3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-ol	176.215	5	2	9.78	1.18
ST038837		2-[5-(benzyloxy)-2-methyl-1H-indol-3-yl]ethan-1-amine	280.364	4	2	13.65	3.25
SureCN8058324		3-(5-phenoxy-1H-indol-3-yl)cyclobutan-1-amine	278.348	4	0	13.66	3.30

Tabla 3bis. Recoge a los compuestos elegidos para realizar el cribado virtual computacional. Las características detalladas de cada uno son el nombre común o en caso de no existir, el nombre que recibe en la base de datos, su nomenclatura según la IUPAC, el peso molecular en Daltons, el número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, el punto isoeléctrico y el coeficiente de partición octanol-agua (LogP).

3.6. Lanzamiento de trabajos de cribado virtual al servidor Proteo.

Para poder realizar el cribado virtual de todos los ligandos con YASARA, se necesitan archivos *.pdb*. Para ello se utilizó el programa *OpenBabelGUI* (<http://openbabel.org/>) que tiene la capacidad de convertir unos formatos de archivo en otros, convirtiendo los archivos *.sdf* de los ligandos en *.pdb*. Para llevar a cabo el cribado global con el programa YASARA mediante el método VINA, es decir, sin fijar una región donde debe producirse la interacción ligando-receptor, se crean dos archivos *.pdb* que reciben el mismo nombre pero se diferencian en la terminación. Ésta debe ser *_ligand* para el ligando y *_receptor* para el receptor. A continuación se debe preparar el macro, un archivo de texto con formato *.mcr*, que contiene el script con las instrucciones para ejecutar el cribado. El script completo se puede visualizar en el Anexo 2 bajo el nombre *dock_run.mcr*. Las dos principales líneas que se deben acomodar a cada trabajo son la ruta principal donde se encuentran los archivos del ligando y el receptor y el número de acoplamiento a realizar, que cuanto mayor es, mayor significancia estadística tendrá el resultado del cribado, pero necesitará mayor tiempo de cálculo. En este caso se eligió que cada cribado se repetiría 500 veces. Ambas líneas aparecen remarcadas en el Anexo 2.

Una vez preparado el script, debe moverse a la misma carpeta donde se encuentran los archivos del ligando y el receptor. Finalmente, desde la terminal, se llega hasta dicha carpeta y se ejecuta el macro mediante el programa YASARA. Este programa debe ejecutarse en formato texto para requerir una menor capacidad de cálculo del servidor y agilizar el trabajo. El comando que debe ejecutarse en la carpeta de trabajo es el siguiente:

nohup /home/... ruta hasta llegar a la carpeta de YASARA/ yasara -txt dock_run.mcr > log_trabajoX.txt &

“nohup ... &” es un comando que libera el ordenador personal del peso del cálculo una vez lanzado al servidor. “yasara -txt” es el comando para ejecutar el programa YASARA en formato de texto, sin un entorno gráfico pesado. “dock_run.mcr” es el macro a ejecutar mediante YASARA. Finalmente, “> log_trabajoX.txt” es un comando que indica al programa escribir todo el progreso del cálculo, incluido cualquier tipo de error que se puede dar, además del resultado final, en un archivo de texto que recibe el nombre de log_trabajoX.txt. Algunas consideraciones a tener en cuenta son que los ligandos en cuyo archivo existen dos moléculas que actúan como contraiones como es el caso de 4-acetoxyDMT (HCl) y AMTB (HF) no se pueden cribar directamente y antes deben eliminarse dichas moléculas pequeñas. Por otra parte, hay que asegurarse de que el receptor no presenta ningún residuo o átomo suelto del resto de proteína.

En el caso del cribado virtual local realizado para algunos de los ligandos, el método a seguir es muy parecido. Primero se debe preparar una escena de YASARA con el receptor y el ligando en la posición donde se quiere cribar, envuelto por una celda de simulación. El archivo que se crea es por tanto un complejo que contiene a estos tres elementos. Debe utilizarse el script “dock_runlocal.mcr”, muy parecido al script anterior, pero en él debe especificarse el programa que se quiere utilizar para realizar el cribado, en este caso AutoDockLS, el número de intentos de cribado y finalmente los residuos cuyas cadenas laterales se quieren dejar sin fijar, que en este caso fueron Asn741, Tyr745 y Tyr826, por estar más próximos al ligando.

3.7. Análisis de los resultados del cribado virtual

Los archivos que se crean por YASARA una vez finalizado el trabajo de cribado tienen el formato .job y representan a cada uno de los agrupamientos o *clusters* creados por el programa, debido a la coincidencia del sitio de interacción en cada uno de los 500 intentos de cribado. Además se crea un archivo con extensión .sce, que representa a una escena en el programa donde están agrupados todos los *clusters* anteriores. Para visualizar los sitios de interacción de los ligandos con la proteína se utilizó el macro *dock_play.mcr*, desde YASARA (*Options>Macro & Movie >Play macro*).

Adicionalmente se utilizaron dos scripts para agilizar el análisis de los resultados. El primero de ellos analiza el archivo de texto donde se vuelcan los resultados para organizarlos, indicando el número de intentos de cribado de cada ligando que muestran interacción con una, dos, tres o cuatro subunidades de la proteína, además de los residuos donde se produce la interacción. Asimismo, efectúa la misma tarea, utilizando la proporción de *clusters* o agrupamientos. Finalmente, proporciona otro archivo de texto donde resume lo anterior, mostrando solamente el porcentaje de intentos de cribado según el número de subunidades con las que hay interacción. Repite lo mismo para los *clusters*. Para ejecutarlo se utiliza el programa *Python IDLE*. El script completo se puede visualizar en el Anexo 3.

El segundo de ellos, se ejecuta mediante YASARA. Sirve para realizar una búsqueda entre los resultados obtenidos y comprobar si ha habido interacción entre los ligandos y alguna zona determinada de la proteína que nos interesa. Dicha zona debe especificarse en el script. Si hay distintas zonas que se quieren comprobar, el script debe ejecutarse con distinto nombre final para no escribir sobre resultados anteriores, ya obtenidos. Además debe especificarse el nombre que recibe el ligando en YASARA. Ese nombre es de tres letras y algunas de las posibilidades son UNK o LIG. El script completo puede verse en el Anexo 4. Se han resaltado las líneas que deben modificarse según cada caso. Los residuos que fueron comprobados para la interacción con los ligandos son 712-733 y 889-958 que corresponden a los giros extracelulares. Estos fueron elegidos debido a que se sospecha que algunas moléculas que interaccionan con el canal TRPM8 lo hacen a través de esta estructura. También se comprobaron los residuos 742-750, 842 y 856 (Bandell. M *et al.*, 2006) ya que corresponden al sitio de unión del mentol y además se ha visto que son el sitio de unión de varios antagonistas del canal (Malkia A. *et al.*, 2009). Y finalmente, los residuos 799, 802-806, correspondientes al sitio de unión de la icilina.

4. Resultados

4.1. Análisis de interacción global

La Figura 3 muestra las interacciones de los ligandos con los estados abierto y cerrado del canal, según el número de cadenas con las que se producen dichas uniones. Del análisis de la interacción de los ligandos con el estado cerrado del canal queda claro que hay una tendencia por la unión a una única subunidad de la proteína. Aun así, se observa aunque con bajo porcentaje, que algunos de los ligandos tienden a unirse a la vez a dos de las subunidades. Finalmente, existen tres ligandos (4-acetoxyDMT, 6-hidroximelatonina y AMTB) que se unen a las cuatro subunidades del canal a la vez, quedando en una posición central del canal. El análisis de los *clusters* que interaccionan con ese mismo estado del canal muestra unos resultados muy parecidos, lo que es de esperar ya que los clusters son simplemente agrupaciones de intentos de cribado en los que el ligando se posiciona cerca de unos determinados residuos.

En cuanto al estado abierto del canal se observa que casi el mismo porcentaje de ligandos tienden a unirse tanto a una como a dos de las subunidades del canal. Este hecho puede deberse a la posibilidad de que el canal abierto forme sitios de unión entre dos subunidades que no están formados, o no completamente, en el estado cerrado, a pesar de que la diferencia entre ambos estados sea mínima. Finalmente, hay solamente dos ligandos (4-acetoxyDMT y AMTB) que interaccionan con las cuatro subunidades a la vez. A pesar de que se podría pensar que estos ligandos fuesen bloqueadores de canal abierto, por localizarse en el centro del poro, esto resulta improbable ya que esta interacción debería darse solamente en el caso del canal en estado abierto. Hay que resaltar también que debido al cambio tan pequeño en el canal entre sus dos estados, posiblemente no permita limitar la unión de los ligandos anteriores a un estado determinado del canal.

En ninguno de los casos se puede observar interacción de los ligandos con tres de las subunidades, lo cual se debe a la forma del canal, centrada en el poro, la cual limita las posiciones que pueden ocupar los ligandos para unirse solamente a tres subunidades.

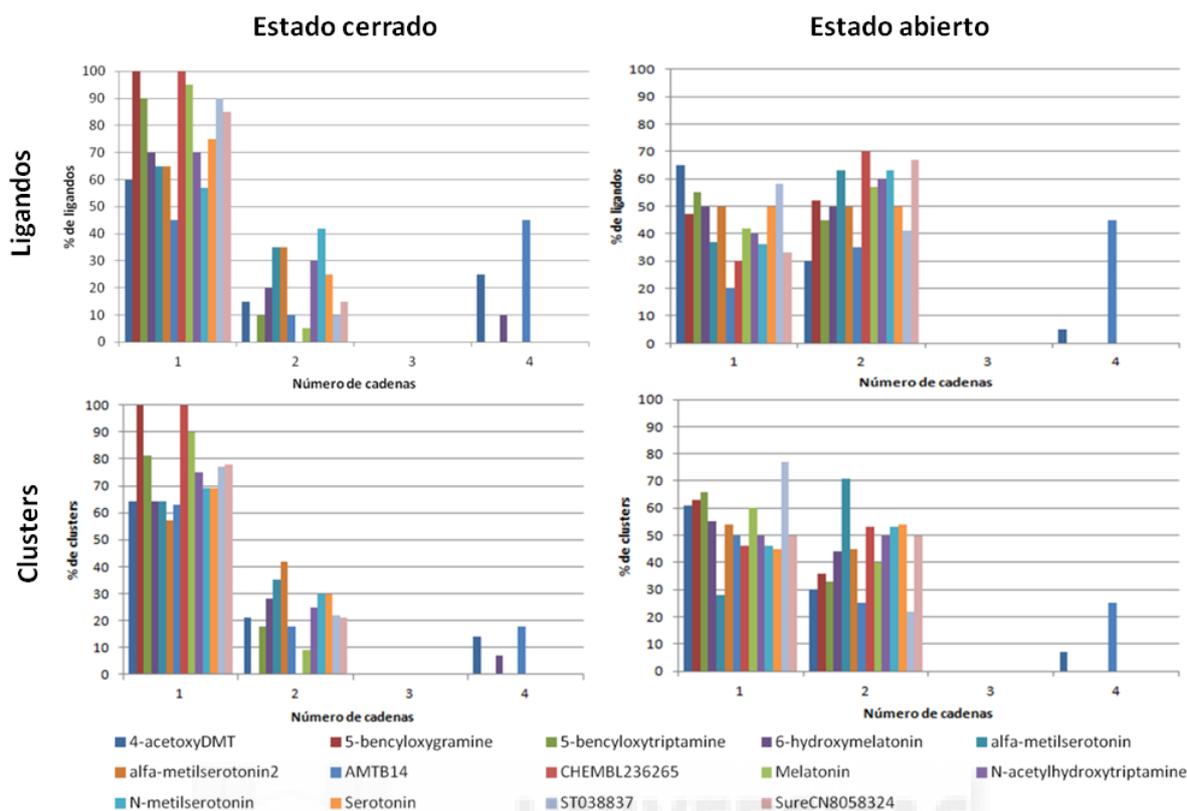


Figura 3. Análisis de interacción global donde se representa el porcentaje de ligandos o de clusters frente al número de cadenas con las que interaccionan, en el estado abierto y cerrado del canal.

4.2. Análisis de interacción individual

La interacción de cada ligando con el receptor se analizó individualmente fijándose en el sitio concreto de unión. Se tuvieron en cuenta varios sitios ya conocidos como el del mentol, la icilina y los giros extracelulares en cuyo caso, aunque no se ha documentado una clara interacción con estos, existen sospechas de que se dé. La energía de unión fue clave para determinar la unión más probable de ocurrir. También se analizó la interacción con partes de la proteína que aunque no sean conocidas como sitio de unión de ninguna molécula, pueden tener alguna importancia por sus características y papel en la funcionalidad del canal.

Dado que se trata de un modelo del canal TRPM8 construido a partir del canal TRPV1, en cuyo caso es posible que los residuos que forman parte del sitio de unión del mentol o la icilina se enfrenten a un entorno distinto, se realizó un cribado virtual local con la molécula de mentol y el estado cerrado del canal, para asegurarse de que se da una interacción entre dicha molécula y el residuo Tyr 745, y que sirva como control positivo. Efectivamente se observó que el mentol adopta una posición cercana a la Tyr 745, dirigiendo su grupo hidroxilo hacia el del aminoácido tirosina, posibilitando la formación de un puente de hidrógeno entre ambos, tal y como se muestra en la Figura 4. La energía de unión del mentol en este caso es 5.870×10^{-6} kcal/mol y ayudará a determinar si las interacciones de los compuestos estudiados con el canal son más propensas de ocurrir o no.

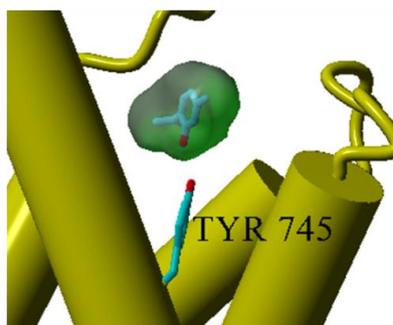


Figura 4. Ilustración del resultado del cribado virtual local, donde el mentol se posiciona cerca de la Tyr 745 posibilitando la formación de un puente de hidrógeno entre los dos grupos hidroxilo que aparecen en rojo.

En las siguientes imágenes se observa la interacción de los distintos ligandos con varias partes del canal TRPM8 en estado cerrado y abierto. Las partes del receptor señaladas en amarillo representan a los residuos que forman parte del sitio de unión del mentol, mientras que en verde los de la icilina. En rojo se muestran los residuos que pertenecen a los giros extracelulares y que están en contacto con el ligando. No en todas las imágenes aparecen etiquetados la totalidad de residuos con los que contacta el ligando, con el fin de facilitar la visualización, aunque sí aparecen en las tablas correspondientes.

4-acetoxyDMT

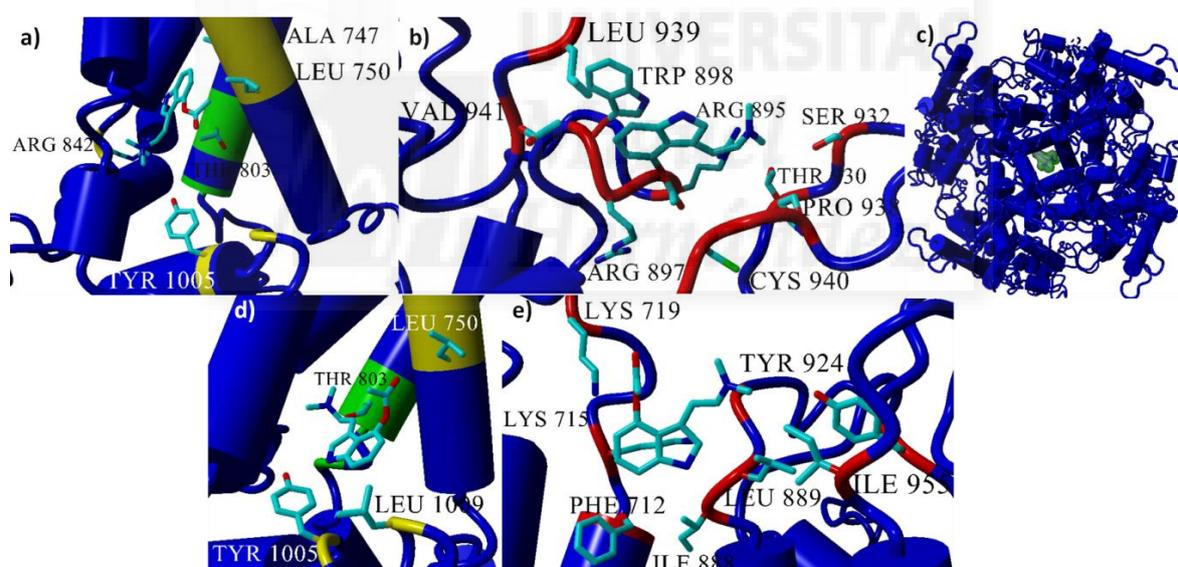


Figura 5. Interacciones de los clusters de 4-acetoxyDMT con TRPM8 en estado cerrado (a-mentol, b-bucles extracelulares, c-poro y e-bucles extracelulares) y abierto (a, d-mentol y e).

Figura 5	a)	b)	c)	d)	e)
Energía de unión (x10 ⁻⁶ kcal/mol)	7.791/ 7.473	7.554	7.500	7.783	7.370/ 6.972
Residuos de unión	A747, L750, T803, R842, Y1005	R895, W896, R897, W898, L939, V941 (A) T930, S932, P938, L939, C940, V941 (B)	V976, A977, G980, Y981	I888, L889, Q891, Y924, I955 (D) F712, K715, K719 (C)	L750, N799, T803, Y1005, L1009
Sitio de unión	Mentol/ Icilina	Giros extracelulares	Poro	Giros extracelulares	Mentol/Icilina
Estado del canal	Cerrado/ Abierto	Cerrado		Abierto	Cerrado/ Abierto

Tabla 4. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 5 para el 4-acetoxyDMT. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las

interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (7.791-7.236), estado abierto (8.195-6.800). Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

Hay que tener en cuenta que la falta de información bibliográfica y experimental relacionada con este ligando limita la comprobación de la veracidad de los resultados obtenidos (Figura 5 y Tabla 4). Éstos indican que existe la posibilidad de interacción con residuos pertenecientes tanto al sitio de unión del mentol como de la icilina. En cuanto al sitio del mentol, los residuos que aparecen implicados en la mayoría de uniones son Leu750 y Tyr1005, mientras que en el caso de la icilina es Thr803. Por otra parte, destaca el hecho de que 4-acetoxyDMT es capaz de unirse a las cuatro subunidades del canal a la vez, posicionándose en el centro del poro y obstruyéndolo. Por último, 4-acetoxyDMT se une a diversos residuos de los giros extracelulares uno de los cuales es una de las cisteínas implicadas en la formación del puente disulfuro, Cys940. Sin embargo y a causa del desconocimiento de la función del resto de residuos, sobre la configuración del canal, unido a la falta de información experimental donde se haya demostrado la unión de algún ligando a dicha parte del canal, solamente se podría especular acerca de la función de los compuestos que se unan a ellos. Los sitios de unión representados anteriormente presentan en todos los casos energías de unión mayores que la del mentol.

5-benciloxigramina

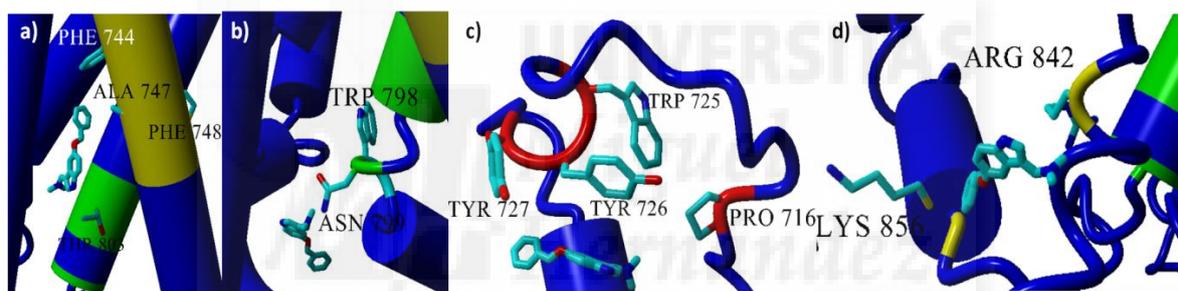


Figura 6. Interacciones de los clusters de 5-benciloxigramina con TRPM8 en estado cerrado (a-mentol, b-icilina y c-bucles extracelulares) y abierto (a, b y d-mentol).

Figura 6	a)	b)	c)	d)
Energía de unión (x10 ⁻⁶ kcal/mol)	8.987/ 9.448	8.795/ 10.136	8.524	9.280
Residuos de unión	F744, A747, W748, T803	W798, N799	P716, W725, Y726, Y727	K856
Sitio de unión	Mentol/ Icilina	Icilina	Giros extracelulares	Mentol
Estado del canal	Cerrado/ Abierto		Cerrado	Abierto

Tabla 5. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 6 para el 5-benciloxigramina. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (8.987-8.524), estado abierto (10.136-8.926). Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

Los resultados obtenidos del cribado global (Figura 6 y Tabla 5) indican la posibilidad de que el ligando se una a los sitios de unión de la icilina (Asn799 y Thr803) y el mentol. El parecido estructural entre la 5-benciloxicigrama y la 5-benciloxitriptamina, que se tratará a continuación, (núcleo aromático, grupo amina y benciléter) hace sospechar sobre la posibilidad de que 5-benciloxicigrama se pueda unir a la Tyr745, aunque este residuo no haya interactuado con el ligando durante el cribado global. Por eso se realizó un cribado local que indica que la unión con este aminoácido se puede dar con una energía de unión de 5.640 kcal/mol. El

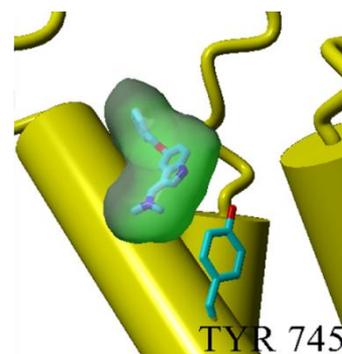


Figura 7. Resultado del cribado local de 5-benciloxicigrama.

resultado se puede observar en la Figura 7. La distancia entre el grupo hidroxilo de la tirosina y la amina secundaria del ligando es de 2.845 Å, suficientemente corta como para que ambos elementos puedan interactuar. Por otra parte parece que el ligando puede interactuar con varios residuos pertenecientes a los giros extracelulares además de la Lys856 que se sospecha de que esté implicada en el sitio de unión del mentol (se tratará con mayor detalle en la “Discusión”). Finalmente, los sitios de unión representados anteriormente presentan en todos los casos energías de unión mayores que la del mentol.

5-benciloxitriptamina (5-BT)

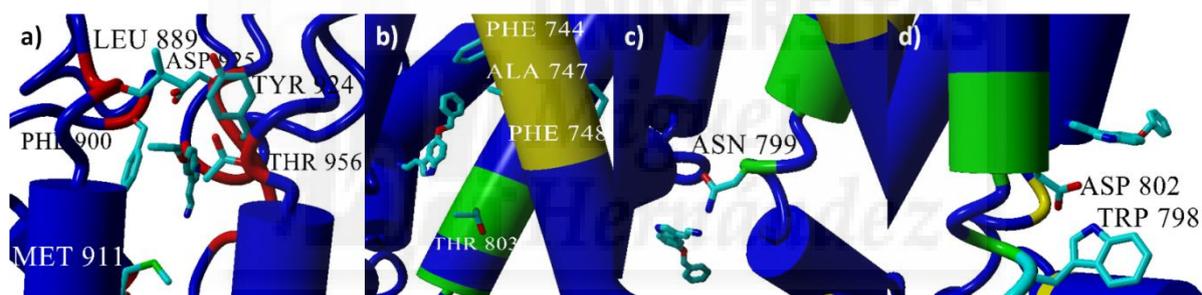


Figura 8. Interacciones de los clusters de 5-benciloxitriptamina con TRPM8 en estado cerrado (a-bucles extracelulares, b-mentol, c-icilina y d-icilina) y abierto (b y c).

Figura 8	a)	b)	c)	d)
Energía de unión (x10 ⁻⁶ kcal/mol)	10.011	9.606/ 9.620	9.398/ 10.097	9.093
Residuos de unión	L889, R890, F900, M911, S921, T923-D925, L943, Y956	F744, A747, F748, T803	N799	W798, D802, G805
Sitio de unión	Giros extracelulares	Mentol/ Icilina	Icilina	Icilina
Estado del canal	Cerrado	Cerrado/ Abierto	Cerrado/ Abierto	Cerrado

Tabla 6. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 8 para el 5-benciloxitriptamina. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (10.011-8.959), estado abierto (10.097-9.442). Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

En diversos estudios (DeFalco et al., 2010; Tesis doctoral Jan-Albert, 2014) se demuestra que el ligando 5-benciloxitriptamina (5-BT) actúa como antagonista del canal TRPM8, tanto activado por frío como por mentol. En dichos casos se propone una posible unión al sitio del mentol y la icilina, por medio de los residuos

Tyr745 y Asn799, respectivamente. Sin embargo, se demuestra por mutagénesis que solamente Tyr745 realmente media la interacción entre el ligando y el canal.

Los resultados de cribado virtual global (Figura 8 y Tabla 6) muestran que puede producirse una interacción tanto en el sitio de unión del mentol como de la icilina, a través de distintos residuos. Dichas interacciones se producen con ambos estados del canal, el abierto y el cerrado y todas ellas presentan una energía de unión mayor que en el caso del mentol. Dadas las evidencias experimentales se decidió realizar un cribado local, para comprobar si se produce la interacción del ligando con la Tyr745. La Figura 9 refleja el resultado obtenido. A pesar de que la distancia entre la amina secundaria del ligando y el hidroxilo de la tirosina sea de 4.236 Å, es posible que ambos grupos interaccionen, con una energía de unión de 7.260 kcal/mol.

A pesar de haber obtenido varias posibles interacciones entre el ligando y las distintas partes del receptor durante el cribado global, al existir evidencias experimentales acerca de que la unión se produce con la Tyr745, los demás resultados cobran menor importancia.

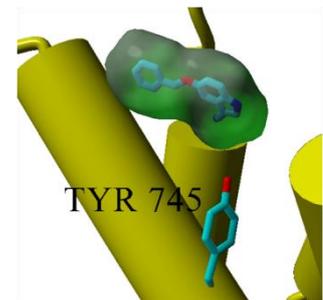


Figura 9. Resultado del cribado local de 5-benciloxitriptamina.

6-hidroximelatonina

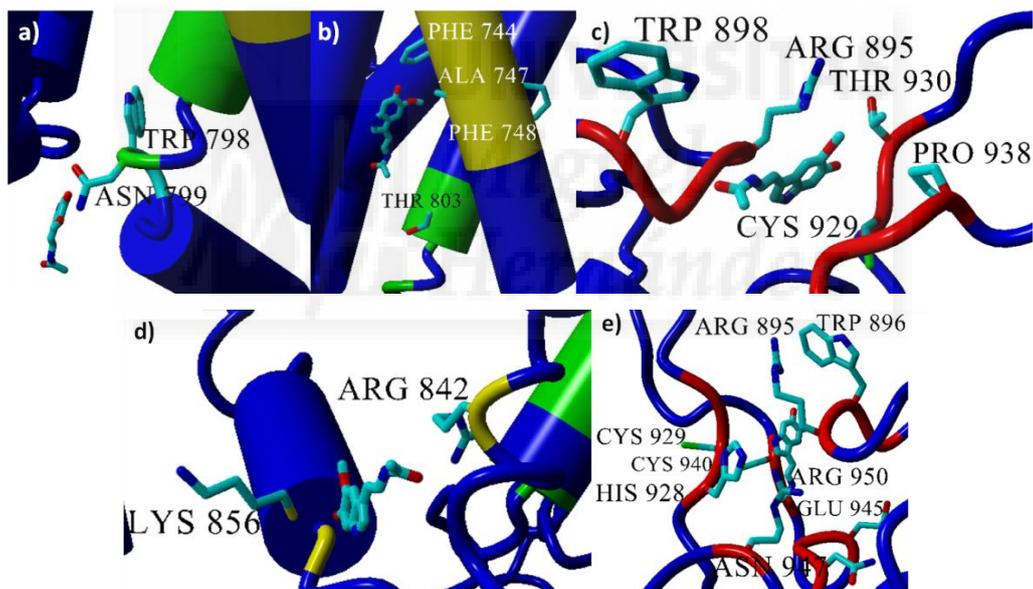


Figura 10. Interacciones de los clusters de 6-hidroximelatonina con TRPM8 en estado cerrado (a-icilina, b-mentol y c-bucles extracelulares) y abierto (a, d-mentol y e-bucles extracelulares).

Figura 10	a)	b)	c)	d)	e)
Energía de unión ($\times 10^{-6}$ kcal/mol)	8.045/ 8.662	7.674	7.537	8.662	8.059
Residuos de unión	W798, N799	F744, A747, F748, T803	R895, W896, R897, W898 (A) C929, T930, P938, L939, C940 (B)	K856	R895, W896, R897 (C) H928, C929(e.p), T930, C940(e.p), V941, E945, Y946, N947(e.p), R950 (D)
Sitio de unión	Icilina	Mentol/ Icilina	Giros extracelulares	Mentol	Giros extracelulares
Estado del canal	Cerrado/ Abierto	Cerrado		Abierto	

Tabla 7. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 10 para el 6-hidroxi-melatonina. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (8.045-7.479), estado abierto (8.662-8.011). Las siglas (e.p.) significan "esqueleto peptídico" y representan el hecho de que la interacción con el ligando se produce a través del esqueleto peptídico y no la cadena lateral de un aminoácido. Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

El ligando 6-hidroxi-melatonina tiene un parecido estructural con el 4-acetoxyDMT basado en el grupo éter y amino, además del núcleo central aromático. Probablemente este parecido posibilite el hecho de que ambos ligandos puedan posicionarse en el poro del canal, uniéndose a sus cuatro subunidades a la vez (imagen no presentada, pero información reflejada en los gráficos de barras de la Figura 3). Según los resultados del cribado (Figura 10 y Tabla 7), el ligando es capaz de unirse a diversos residuos de los giros extracelulares, entre los que destacan las Cys929 y Cys940. También se observa la posibilidad de unión al sitio de la icilina a través del residuo Ans799 y Thr803 y el del mentol a través de Phe744, Ala747 y Phe748. Los sitios de unión representados anteriormente presentan en todos los casos energías de unión mayores que la del mentol.

Alfa-metilserotonina y alfa-metilserotonina2

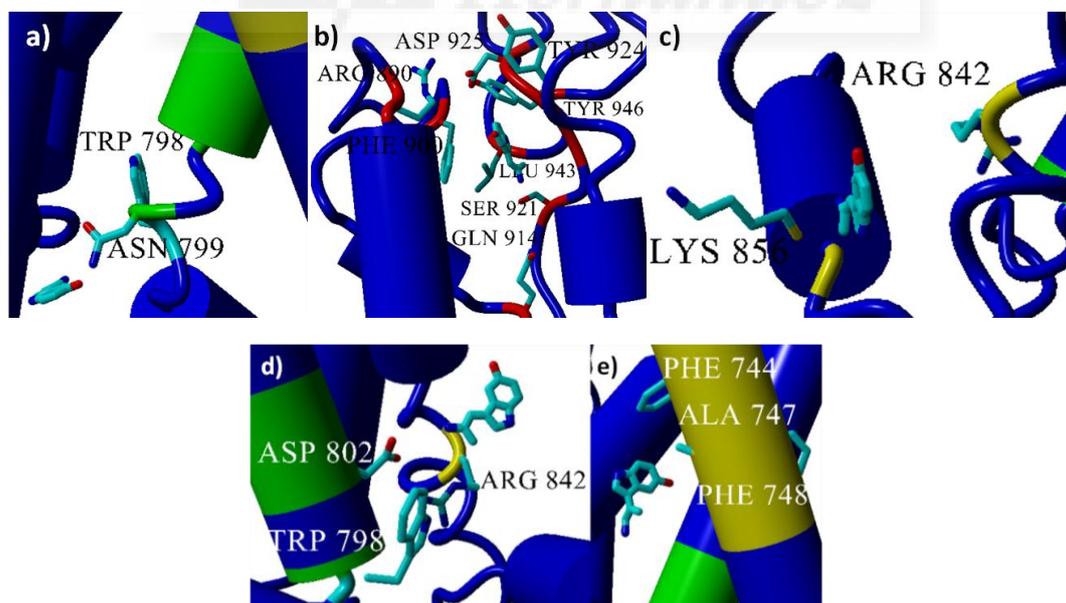


Figura 11. Interacciones de los clusters de alfa-metilserotonina (a, b, c y d) y alfa-metilserotonina2 (todos los apartados) con TRPM8 en estado cerrado(a-icilina) y abierto (a, b-bucles extracelulares, c-mentol, d-icilina y e-mentol).

Figura 11	a)	b)	c)	d)	e)
Energía de unión (x10 ⁻⁶ kcal/mol)	8.370/ 7.805/ 7.940	9.077/ 9.007	9.051/ 8.339	9.033/ 8.133	7.827
Residuos de unión	W798, N799	L889, R890, F900, Q914, S921, T922, T923, Y924, D925, L943, Y946	K856 (e.p)	W798, D802	F744, A747, F748 (e.p)
Sitio de unión	Icilina	Giros extracelulares	Mentol	Icilina	Mentol
Ligando	Alfa-metilserotonina/2	Alfa-metilserotonina/2	Alfa-metilserotonina/2	Alfa-metilserotonina/2	Alfa-metilserotonina2
Estado del canal	Cerrado/ Abierto	Abierto			

Tabla 8. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 11 para el alfa-metilserotonina y alfa-metilserotonina2. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Alfa-metilserotonina (Estado cerrado (8.572-8.232), estado abierto (9.128-8.317)) y alfa-metilserotonina2 (Estado cerrado (8.404-7.575), estado abierto (9.007-7.741)). Las siglas (e.p.) significan “esqueleto peptídico” y representan el hecho de que la interacción con el ligando se produce a través del esqueleto peptídico y no la cadena lateral de un aminoácido. Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

Se observa que según los resultados del cribado (Figura 11 y Tabla 8), las dos formas del ligando son capaces de unirse al sitio del mentol, la icilina y a varios residuos de los giros extracelulares (con una energía de unión mayor que la del mentol), lo que indica una falta de estereoespecificidad por parte de los sitios de unión. En este caso llama la atención que las dos formas del ligando se unen sobre todo al canal abierto, mientras que con el cerrado interactúan solamente con Asn799. Ya que se observó un parecido estructural (cadena alifática con grupo amino terminal) con otros ligandos como el 5-benciloxigramina y el 5-BT que se unen a la Tyr745, se realizó un cribado local para comprobar si el alfa-metilserotonina o el alfa-metilserotonina2 son también capaces de hacerlo. En el resultado obtenido, el ligando se posicionaba muy lejos del aminoácido tirosina, por lo que no se puede unir a éste (imagen no mostrada).

AMTB

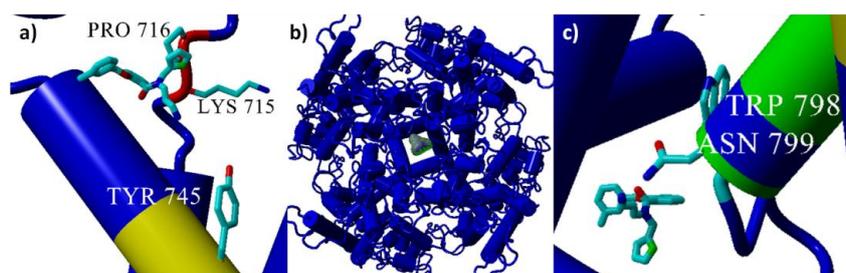


Figura 12. Interacciones de los clusters de AMTB14 con TRPM8 en estado cerrado (a-mentol y b-poro) y abierto (c-icilina).

Figura 12	a)	b)	c)
Energía de unión (x10 ⁻⁶ kcal/mol)	8.549	8.469	8.880
Residuos de unión	K715, P716, Y745	D918 (A, B, C, D)	N799, W798
Sitio de unión	Mentol/ Giros extracelulares	Poro	Icilina
Estado del canal	Cerrado		Abierto

Tabla 9. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 12 para el AMTB. En el apartado b), las siglas A, B, C y D representan el hecho de que la interacción se produce con el residuo D918 de las cuatro subunidades. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las

interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (9.305-8.469) estado abierto (9.601-8.772). Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

Debido al parecido estructural entre el antagonista AMTB y el 5-BT que se refleja en que ambos ligandos tienen un benciléter y una amina primaria además de un núcleo central aromático, es de esperar que se unan al mismo sitio. De hecho este es el único compuesto cuyos resultados de cribado global (Figura 12 y Tabla 9) muestran una interacción con la Tyr745, clave para el sitio del mentol. Sin embargo, como la distancia entre el compuesto y la cadena lateral de la tirosina parece ser bastante grande, se realizó un cribado local para acomodar mejor el ligando. Así se puede demostrar una clara interacción con la Tyr745, tal y como se muestra en la Figura 13. La distancia entre el grupo hidroxilo de la tirosina y el carboxilo del ligando es de 2.396 Å, lo que indica que ambos están suficientemente cerca para interactuar, presentando una energía de unión de 6.730 kcal/mol.

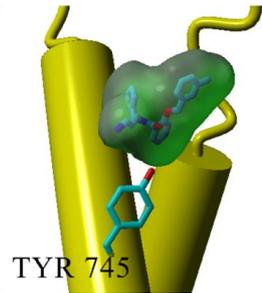


Figura 13. Resultado del cribado local de AMTB.

Es posible que AMTB se una al sitio de la icilina dada la proximidad de la cadena lateral de Asn799 y el grupo amina del ligando. Finalmente y a pesar de la diferencia estructural existente entre este compuesto, 4-acetoxymetol y 6-hidroximetol, reflejada en su mayor tamaño, parece ser que AMTB también es capaz de posicionarse en el centro del poro.

Todas las interacciones de este ligando con el canal tienen una mayor energía de unión que la del mentol.

CHEMBL236265

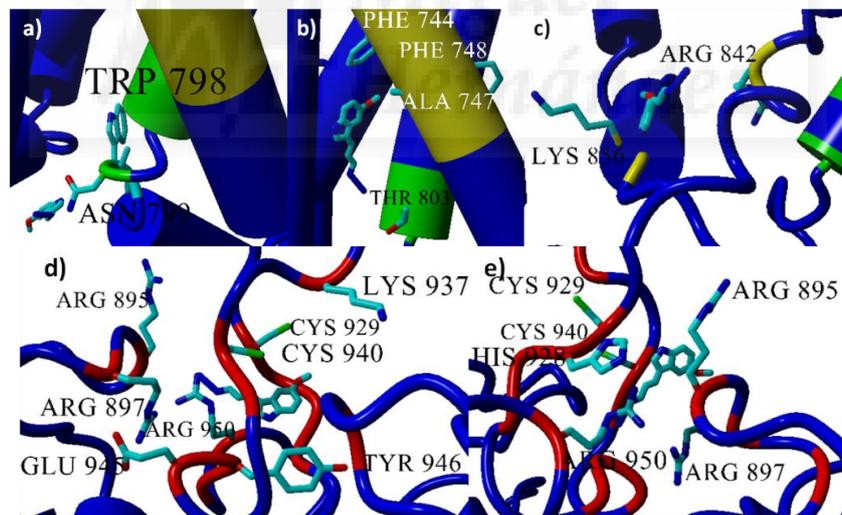


Figura 14. Interacciones de los clusters de CHEMBL236265 con TRPM8 en estado cerrado (a-icilina y b-mentol) y abierto (a, c-mentol, d-bucles extracelulares y e-bucles extracelulares).

Figura 14	a)	b)	c)	d)	e)
Energía de unión ($\times 10^{-6}$ kcal/mol)	7.995/ 7.974	7.684	8.511	8.164	8.075
Residuos de unión	W798, N799	F744, A747, F748, T803	K856	I899, F926 (e.p), S927, H928, C929, K937, C940, V941, E945, Y946 (e.p), N947, R950	H928, C929, T930, P938, L939, C940, E945, Y946, N947, R950 (D) R895, W896 (e.p), R897 (C)
Sitio de unión	Icilina	Mentol	Mentol	Giros extracelulares	Giros extracelulares
Estado del canal	Cerrado/ Abierto	Cerrado	Abierto		

Tabla 10. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 14 para el CHEMBL236265. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (8.108-7.650) estado abierto (8.918-7.974). Las siglas (e.p.) significan “esqueleto peptídico” y representan el hecho de que la interacción con el ligando se produce a través del esqueleto peptídico y no la cadena lateral de un aminoácido. Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

Los resultados del cribado (Figura 14 y Tabla 10) muestran que el ligando es capaz de unirse al sitio de la icilina a través de Asn799 y otros residuos cercanos a este sitio de unión como W798. Además, se posiciona entre las cisteínas 929 y 940. Finalmente también es capaz de unirse a residuos del sitio de unión del mentol. Todas las interacciones de este ligando con el canal tienen una mayor energía de unión que la del mentol.

Melatonina

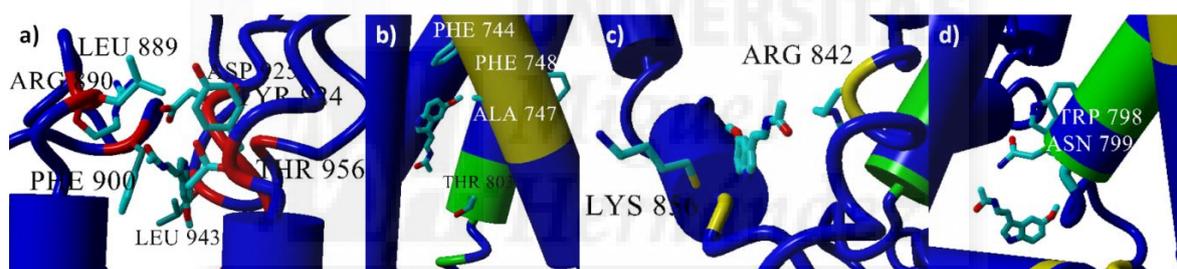


Figura 15. Interacciones de los clusters de melatonina con TRPM8 en estado cerrado (a-bucles extracelulares, b-mentol y c-mentol) y abierto (a, b y d-icilina).

Figura 15	a)	b)	c)	d)
Energía de unión ($\times 10^{-6}$ kcal/mol)	8.884/ 10.167	8.754/ 9.030	8.474	9.237
Residuos de unión	L889, R890, F900, A910, S921, T923, Y924 (e.p), D925, L943, Y946, T956	W798, N799	F744, A747, F748 (e.p), T803	K856
Sitio de unión	Giros extracelulares	Icilina	Mentol/ Icilina	Mentol
Estado del canal	Cerrado/Abierto		Cerrado	Abierto

Tabla 11. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 15 para la melatonina. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (8.884-8.295) estado abierto (10.167-8.633). Las siglas (e.p.) significan “esqueleto peptídico” y representan el hecho de que la interacción con el ligando se produce a través del esqueleto peptídico y no la cadena lateral de un aminoácido. Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

La melatonina tiene un gran parecido estructural con la serotonina, y aunque tiene un tamaño ligeramente superior, tiene el mismo núcleo central y una cadena lateral con un grupo amina. Este hecho se refleja en que se sintetiza a partir de la serotonina. Dado que la serotonina es incapaz de unirse al sitio del mentol (tratada más adelante), es de esperar que con la melatonina ocurriera lo mismo, aunque uno de los

resultados anteriores (Figura 15 y Tabla 11) muestre la posibilidad de interactuar con varios residuos pertenecientes a dicho sitio de unión. Por otra parte destaca el residuo Asn799 del sitio de la icilina. Debido a la falta de información experimental, es difícil garantizar que esto se produzca. Parece ser capaz también de interactuar con Lys856. Las energías de unión del ligando en el caso de todas las interacciones anteriores resultan ser mayores que la de referencia del mentol.

N-acetilhidroxitriptamina

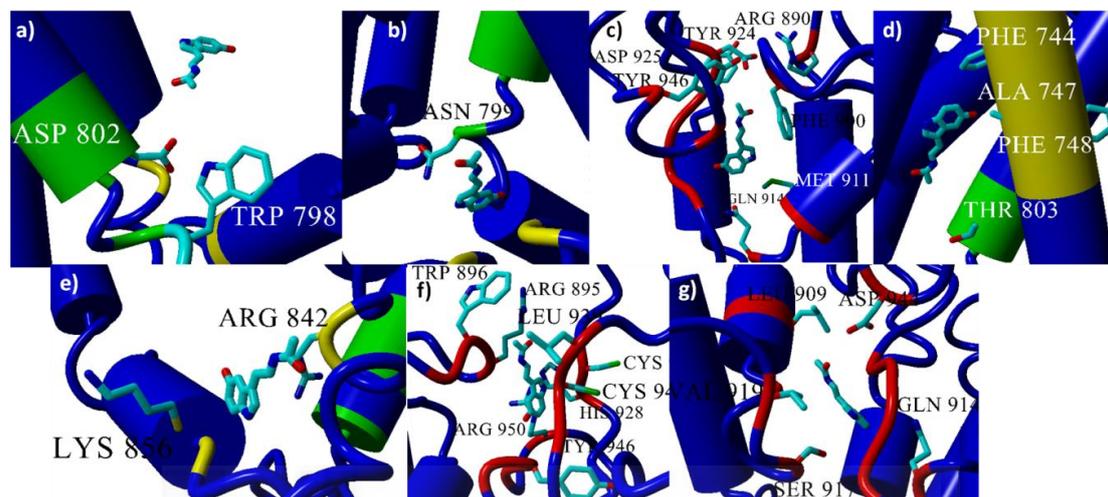


Figura 16. Interacciones de los clusters de N-acetilhidroxitriptamina con TRPM8 en estado cerrado (a-icilina, b-icilina, c-bucles extracelulares y d-mentol) y abierto (a, b, c, e-mentol, f-bucles extracelulares y g-bucles extracelulares).

Figura 16	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)
Energía de unión ($\times 10^{-6}$ kcal/mol)	9.170/ 8.861	9.012/ 8.968	8.671/ 9.971	8.583	9.433	8.952	8.821
Residuos de unión	W798, D802	N799	R890, F900, A910, 911, 914, S921, 922, T923 (e.p), Y924 (e.p), D925, L943, Y946	F744, A747, F748 (e.p), T803	K856	R895, W896, R897 (C) H928, C929 (e.p), L939, C940 (e.p), V941, E945 (e.p), Y946, N947 (e.p), R950 (D)	L909, G913, S917, V919 (A) Q914, (D918, V919, D920, S921) (e.p), T922, D944 (B)
Sitio de unión	Icilina	Icilina	Giros extracelulares	Mentol/ Icilina	Mentol	Giros extracelulares	Giros extracelulares
Estado del canal	Cerrado/ Abierto			Cerrado	Abierto		

Tabla 12. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 16 para la N-acetilhidroxitriptamina. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (9.170-8.268) estado abierto (9.971-8.786). Las siglas (e.p.) significan "esqueleto peptídico" y representan el hecho de que la interacción con el ligando se produce a través del esqueleto peptídico y no la cadena lateral de un aminoácido. Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

La N-acetilhidroxitriptamina tiene una estructura química muy parecida a la serotonina, diferenciándose solamente por un grupo acetilo presente en la cadena alifática que en el caso de la serotonina tiene un grupo amino terminal. Parece que el ligando es capaz de posicionarse entre los residuos de cisteína de los giros extracelulares, aunque en este caso, la interacción con éstos es sobre todo a través de su esqueleto peptídico. Además, puede unirse al residuo Asp920 que se cree relevante para el mantenimiento de la estabilidad de los estados del canal, y se encuentra en los giros extracelulares (B. Nilius *et al.*, 2005).

Finalmente, es capaz de unirse al sitio del mentol y la icilina a través de diversos residuos (Figura 16 y Tabla 12), presentando energías de unión mayores que las del mentol.

N-metilserotonina

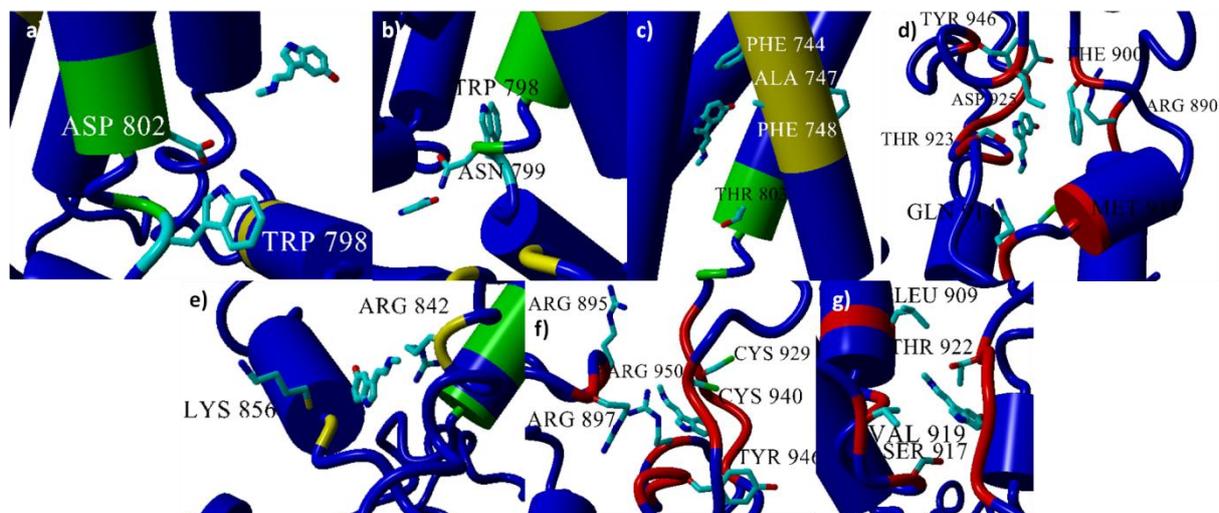


Figura 17. Interacciones de los clusters de N-metilserotonina con TRPM8 en estado cerrado (a-icilina, b-icilina y c-mentol) y abierto (b, c, d-bucles extracelulares, e-mentol, f-bucles extracelulares y g-bucles extracelulares).

Figura 17	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)
Energía de unión (x10 ⁻⁶ kcal/mol)	7.972	7.509/ 7.720	7.267/ 7.578	8.394	7.939	7.608	7.585
Residuos de unión	W798, D802	W798, N799	F744, A747, F748 (e.p), T803	L889, R890, F900, M911, Q914, S921, T923, Y924, D925, L943, Y946, T956	K856	R895, R897 (A) F926, S927(e.p), H928, C929 (e.p), L939, C940 (e.p), V941, E945 (e.p), Y946, N947 (e.p), R950 (B)	L909, G913, S917, V919 (A) (D918, V919, D920, S921) (e.p), T922 (B)
Sitio de unión	Icilina	Icilina	Mentol/Icilina	Giros extracelulares	Mentol	Giros extracelulares	Giros extracelulares
Estado del canal	Cerrado	Cerrado/Abierto		Abierto			

Tabla 13. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 17 para la N-metilserotonina. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (7.972-7.244) estado abierto (8.394-7.573). Las siglas (e.p.) significan "esqueleto peptídico" y representan el hecho de que la interacción con el ligando se produce a través del esqueleto peptídico y no la cadena lateral de un aminoácido. Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

La N-metilserotonina se diferencia de la serotonina en un grupo metilo unido al amino terminal de la cadena alifática de la serotonina, lo cual transforma la amina de primaria a secundaria. Sin embargo, este es un cambio muy pequeño y es de esperar que este ligando se comporte de igual forma que la serotonina. De hecho en los resultados (Figura 17 y Tabla 13) se destacan varios residuos del sitio de unión de la icilina, en vez del sitio del mentol. También, al igual que en el caso de la serotonina, se observa que el ligando se posiciona en los giros extracelulares, entre los residuos de cisteína y el residuo Asp920. Asimismo las energías de unión en todas las interacciones son mayores que la del mentol.

Serotonina

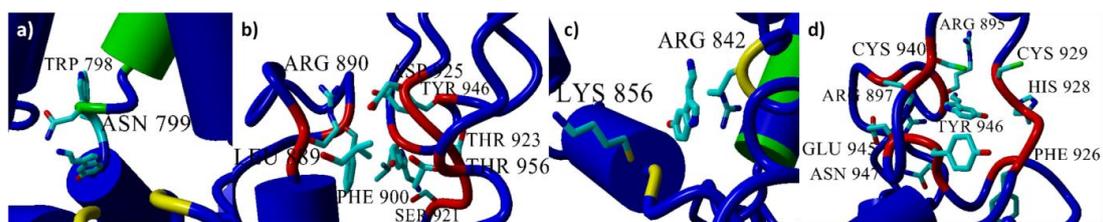


Figura 18. Interacciones de los clusters de serotonina con TRPM8 en estado cerrado (a-icilina) y abierto (a, b-bucles extracelulares, c-mentol y d-bucles extracelulares).

Figura 18	a)	b)	c)	d)
Energía de unión ($\times 10^{-6}$ kcal/mol)	7.800/ 7.471	8.421	8.156	7.483
Residuos de unión	W798, N799	L889, R890, F900, S921, T922 (e.p), T923, Y924 (e.p), D925, L943, Y946, T956	K856	R895, R897 (A) F926, S927 (e.p), H928, C929, C940, V941 (e.p), E945, Y946, N947, 950 (B)
Sitio de unión	Icilina	Giros extracelulares	Mentol	Giros extracelulares
Estado del canal	Cerrado/ Abierto	Abierto		

Tabla 14. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 18 para la serotonina. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (7.800-7.492) estado abierto (8.421-7.458). Las siglas (e.p.) significan "esqueleto peptídico" y representan el hecho de que la interacción con el ligando se produce a través del esqueleto peptídico y no la cadena lateral de un aminoácido. Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

Debido a que 5-BT actúa como agonista para el receptor de la serotonina, es de esperar por tanto que la serotonina tenga algún efecto sobre el canal TRPM8. Sin embargo, tal y como se muestra en el trabajo de DeFalco et al.,2010, esto no se observa. De hecho, los resultados del cribado global (Figura 18 y Tabla 14) muestran que existe interacción solamente con el residuo Lys856 de los pertenecientes al sitio de unión del mentol. Sin embargo, la serotonina sí podría unirse a Asn799.

Por otra parte se observa que la serotonina es capaz de interactuar con residuos posicionados en los giros extracelulares del canal posicionándose entre dos residuos de cisteína (Cys929 y Cys940). Todas las interacciones de este ligando con el canal tienen una mayor energía de unión que la del mentol.

ST038837

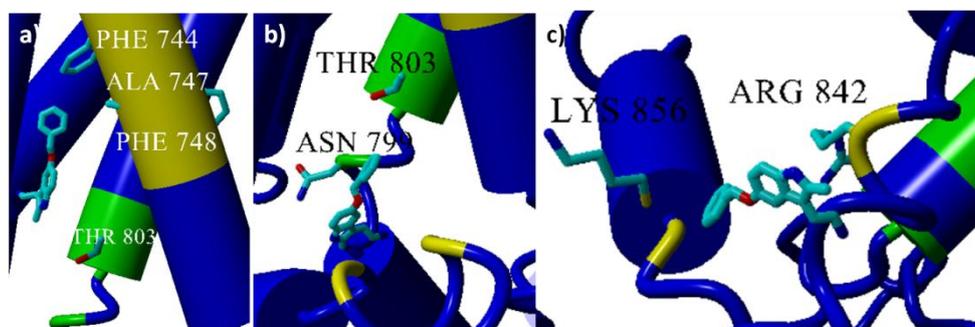


Figura 19. Interacciones de los clusters de ST038837 con TRPM8 en estado cerrado (a- mentol y b-icilina) y abierto (a, b y c- mentol).

Figura 19	a)	b)	c)
Energía de unión (x10 ⁻⁶ kcal/mol)	9.791/ 10.271	9.497/ 10.588	9.587
Residuos de unión	F744, A747, F748, T803	N799, T803	K856
Sitio de unión	Mentol/ Icilina	Icilina	Mentol
Estado del canal	Cerrado/ Abierto		Abierto

Tabla 15. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 19 para ST038837. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (9.791-8.999) estado abierto (10.588-9.587). Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

El ligando ST038837 tiene una estructura química bastante parecida al 5-BT, diferenciándose solamente en la presencia de un metilo unido al núcleo central aromático. Es por eso que se realizó un cribado local, para comprobar la posible interacción con la Tyr745 del sitio de unión del mentol. El resultado obtenido se puede observar en la Figura 20. La distancia existente entre el grupo hidroxilo de la tirosina y la amina secundaria del ligando es de 3.959 Å, mientras que con la amina primaria es de 4.065 Å. A pesar de que no sean distancias relativamente cortas y que garanticen la formación de puentes de hidrógeno, es posible que dicho puente se forme (presentando una energía de unión de 5.700 kcal/mol), más teniendo en cuenta que se trata de un modelo del canal. Por otra parte cabe destacar el resultado de cribado global (Figura 19 y Tabla 15) que muestra una interacción del ligando con el residuo Lys856 que está involucrado en mantener la conformación del canal a través de la interacción con varios residuos pertenecientes al sitio de unión del mentol (A. Pedretti *et al.*, 2009). Finalmente, también se debería destacar la interacción repetida con el residuo Asn799 del sitio de unión de la icilina. Todas las interacciones anteriores presentan una energía de unión mayor que la del mentol.

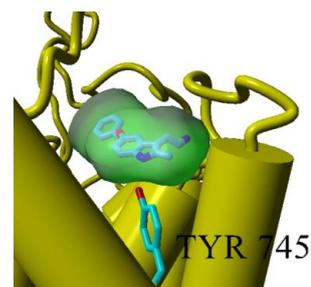


Figura 20. Resultado del cribado local de ST038837.

SureCN8058324

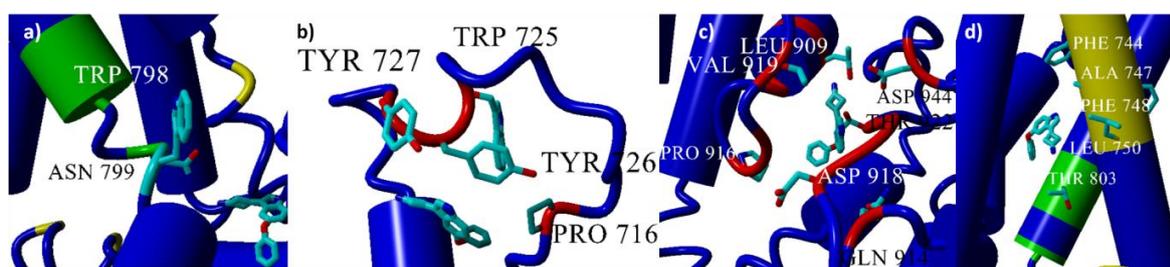


Figura 21. Interacciones de los clusters de SureCN8058324 con TRPM8 en estado cerrado (a-icilina, b-bucles extracelulares y d-mentol) y abierto (a, c-bucles extracelulares y d).

Figura 21	a)	b)	c)	d)
Energía de unión (x10 ⁻⁶ kcal/mol)	10.415/ 10.523	9.618	10.485	9.770/ 10.224
Residuos de unión	W798, N799	P716, W725, Y726, Y727	Q914, D918, (V919, D920, S921) (e.p), T922, D944 (D), L909, F912, G913, P916, S917, V919 (C)	F744, A747, F748, L750, T803
Sitio de unión	Icilina	Giros extracelulares	Giros extracelulares	Mentol/ Icilina
Estado del canal	Cerrado/ Abierto	Cerrado	Abierto	Cerrado/ Abierto

Tabla 16. Resume las características más destacadas de los sitios de unión representados en la Figura 21 para SureCN8058324. Para obtener una idea mejor de la probabilidad de ocurrencia y/o importancia de cada una de las interacciones representadas, a continuación se presenta el rango de energía entre el que están comprendidas: Estado cerrado (10.415-9.196) estado abierto (10.914-10.224). Las siglas (e.p.) significan “esqueleto peptídico” y representan el hecho de que la interacción con el ligando se produce a través del esqueleto peptídico y no la cadena lateral de un aminoácido. Se recuerda que la energía de unión del mentol es de 5.870 kcal/mol.

Por último, este ligando también tiene un parecido estructural con el 5-BT, diferenciándose en poseer en vez de una cadena alifática donde se une el grupo amino, un ciclobutano al que se une dicho grupo. En este caso también se realizó un cribado local, con el mismo objetivo que en los casos anteriores. El resultado se observa en la Figura 22. La distancia entre la amina primaria y el grupo hidroxilo de la tirosina es de 2.955 Å, lo que indica que existe una gran probabilidad de que haya interacción entre ambos grupos, con una energía de unión de 7.710 kcal/mol. Por otro lado, la interacción con el sitio de la icilina se puede producir a través de Asn799 o Thr803.

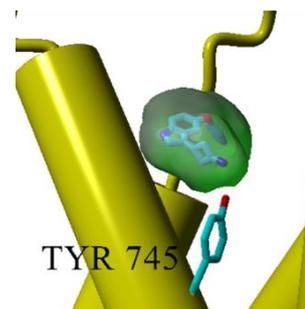


Figura 22. Resultado del cribado local de SureCN8058324.

5. Discusión

Los ligandos analizados en el presente trabajo podrían clasificarse en tres grupos principales según su parecido en cuanto a la estructura química. En primer lugar destacan los ligandos 5-benciloxigramina, 5-benciloxitriptamina, AMTB, ST038837 y SureCN8058324, todos ellos caracterizados por poseer un núcleo central aromático al que se une un benciléter y una cadena alifática con un grupo amino (excepto en el caso de SureCN8058324, donde se trata de un ciclobutano). Parece claro que todos ellos son capaces de unirse a la Tyr745 además de interactuar con varios de los residuos comprendidos entre 742 y 750 del sitio de unión del mentol, por medio de contactos apolares. En el modelo de TRPM8 construido a partir del canal $K_v1.2$ (Malkia A, *et al.*, 2009) se especifica que los residuos Tyr745 y Glu802 interactúan entre sí de forma polar, estabilizando el estado cerrado del canal. En este caso el mentol que se une a Tyr745 rompe esta interacción y provoca un cambio conformacional que abre el canal. En dicho modelo estos dos aminoácidos están muy cercanos entre sí, hecho que no sucede en el modelo construido a partir de TRPV1, por lo que la unión de los ligandos a la Tyr745 no produciría el mismo efecto. Para ello se ha intentado buscar otro residuo que esté cerca de la Tyr745 y que pueda tener alguna función en la estabilización de los estados del canal. De entre todos los residuos analizados, el único que parece que podría interactuar con la Tyr745 es la Tyr826 que se encuentra en el giro extracelular que conecta S2 y S3. Como se puede observar en la Figura 23, el puente de hidrógeno que posiblemente se forme entre estas dos tirosinas puede romperse cuando un ligando interactúe con la Tyr745. Debido al cambio tan ligero que se produce en la estructura del canal al pasar del estado cerrado al abierto es difícil ver diferencias en las posiciones de estos dos residuos de tirosina en ambos estados del canal.

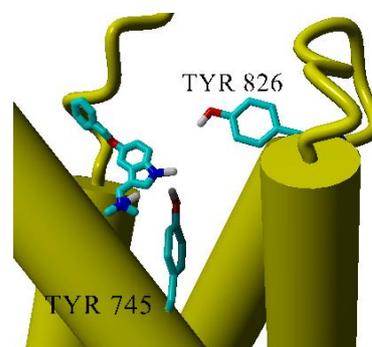


Figura 23. Posición de Tyr745 y Tyr826.

Hasta el momento, en la bibliografía no se ha especificado una interacción directa de algún ligando con Lys856, sin embargo se cree que este residuo tiene un papel importante en el mantenimiento de la conformación del canal a través del contacto con Arg842, siendo ambos residuos destacables para el sitio de unión del mentol (A. Pedretti *et. al*, 2009). A pesar de ello, los resultados del cribado virtual indican la interacción de varios de estos ligandos con el residuo Lys856, posicionándose entre éste y el residuo Arg842, dificultando la interacción entre ambos. Cabe destacar que la unión al residuo Lys856 se da únicamente en el caso del canal iónico en estado abierto.

Por otra parte, los cinco ligandos son capaces de interactuar con residuos pertenecientes al sitio de unión de la icilina, como Asn799, Asp802 y Thr803, tanto en el caso del canal en estado cerrado como abierto. Además, y aunque hasta el presente momento no existían evidencias sobre la interacción con el residuo Trp798, los resultados obtenidos indican que en un gran número de casos, los ligandos interactúan con él. Es posible que debido a la cercanía entre Asp802 y Trp798 además de los grupos químicos que presentan ambos residuos, exista una interacción entre ambos, que de normal establezca la hélice de la que forman parte. Si un ligando se posiciona entre ellos, esta interacción se rompería produciendo una desestabilización. Teniendo en cuenta las energías de unión de todos los intentos de cribado de estos ligandos, destaca el hecho que en el caso del canal abierto, las interacciones con mayor energía son las que se producen con los residuos del sitio de unión de la icilina. En el caso del estado cerrado, las interacciones de mayor energía se producen tanto con residuos del sitio de mentol como la icilina. Las interacciones con los giros extracelulares son menos energéticas y por tanto tienen menor prioridad de suceder. Entre ellas hay que destacar la que se produce con Asp920 que se encuentra en la entrada del poro, y varios residuos adyacentes. Estudios mutacionales revelan que la neutralización de este residuo resulta en un canal inactivo, hecho que podría lograrse por los ligandos. Además de normal Asp920 interactúa con Arg890 y Arg897 y al posicionarse un ligando entre ellos dicha unión podría romperse y conllevar a la obstrucción del poro.

En segundo lugar, cabría destacar el grupo formado por los ligandos serotonina y sus derivados N-metilserotonina, N-acetilhidroxitriptamina, alfa-metilserotonina y 4-acetoxymt cuyo parecido no es tan alto pero aun así comparte el núcleo aromático y la cadena alifática del resto de compuestos del grupo. A pesar de que los resultados del cribado muestran que estos ligandos son capaces de unirse a residuos que forman parte del sitio de unión del mentol, debido a que ya ha sido determinado en varios trabajos que la serotonina es incapaz de unirse a la Tyr745, estos se despreciarán. Además se realizó un cribado local en el sitio del mentol para comprobar que efectivamente no hay interacción con la Tyr745. A pesar de que se obtuvo un cluster que se posiciona cerca de este residuo, la energía de unión que presentaba era la más baja. Por otra parte, en un gran número de ocasiones, estos ligandos interactúan con Asn799 y otros residuos del sitio de unión de la icilina, estando el canal en estado abierto y cerrado. Aun así, lo que más llama la atención de este grupo, es la capacidad de los ligandos de posicionarse en los giros extracelulares, entre los residuos de cisteína 929 y 940 que forman el puente disulfuro. Además, esta interacción se produce únicamente con el canal en estado abierto, por lo que si se produce un cambio conformacional, el canal podría quedar bloqueado o inactivo. De entre todos los clusters formados por estos ligandos, para el canal abierto y que indican una posible unión con alguna de las partes consideradas como primordiales del canal (sitio del mentol, la icilina y los giros

extracelulares), el 49.33% muestran unión a Cys929 y Cys940, frente al 0% en el caso del canal cerrado. Todos los ligandos de este grupo presentan la energía de unión más alta cuando interactúan con residuos del sitio de unión de la icilina, en el caso del canal en estado cerrado. Por otra parte, con el canal abierto, las interacciones de más energía se producen con los giros extracelulares, en concreto con el residuo Asp920 u otros adyacentes. Por último, cabe decir que la totalidad de este grupo interactúa con Lys856 solamente en el caso del canal abierto.

Finalmente el tercer grupo compuesto por la melatonina, CHEMBL236265 y 6-hidroximelatonina parece ser capaz de interactuar con residuos del sitio del mentol, la icilina y los giros extracelulares, destacando en este último caso Cys929 y Cys940 y el Asp920. Viendo las energías de unión de cada ligando, no se observa ningún sitio de unión primordial para los dos estados del canal.

Los ligandos del grupo de 5-BT parecen ser los únicos suficientemente grandes como para interactuar con la Tyr745 y algunos de los residuos 742-750, por medio de interacciones hidrofóbicas. Además son los que mejor se adaptan al espacio que queda entre las hélices S2 (sitio del mentol) y S3 (sitio de la icilina), pudiendo contactar a la vez con residuos de ambos sitios de unión. En este caso, las interacciones hidrofóbicas se forman con los residuos Phe744, Ala747 y Phe748 sobre todo, quedando la cadena alifática con el grupo amino dirigido hacia los residuos polares Asp802 y Asn799. Estas interacciones se observan en el caso de otros ligandos pero con energías de unión menores, lo cual puede deberse al tamaño más reducido del resto de ligandos que limita el contacto con los aminoácidos más importantes. Los compuestos del grupo de la serotonina, al presentar menor tamaño se posicionan la mayoría de veces cerca de Asn799 interactuando solo con este residuo. En el caso de los giros extracelulares, en concreto los residuos cercanos a Asp920, parecen ser preferidos por ligandos como la serotonina. Esto posiblemente se deba a que los residuos de estas posiciones son polares y algunos de ellos presentan carga. La serotonina y sus derivados son los únicos que presentan un grupo hidroxilo en su estructura química, el cual junto con el grupo amino es capaz de formar fácilmente puentes de hidrógeno. El resto de ligandos suelen presentar un grupo éter, el cual es incapaz de compartir hidrógenos y por tanto no puede formar puentes de hidrógeno. En el caso de las interacciones con los giros extracelulares en la zona donde están Cys929 y Cys940 hay una gran cantidad de residuos polares, algunos de ellos cargados. Además en esta región parece que las distintas subunidades se estabilizan por medio de la formación de puentes de hidrógeno entre residuos que se encuentran enfrentados y que tienen grupos electronegativos. Parece ser que los ligandos que más tienden a unirse a esta parte de los giros son aquellos que tengan un tamaño mediano-reducido y que presenten grupos hidroxilo y amino en su estructura. En la Figura 24 se pueden observar los residuos enfrentados que posiblemente ayuden a estabilizar las subunidades y cómo la cercanía con el ligando podría interferir en esa estabilización.

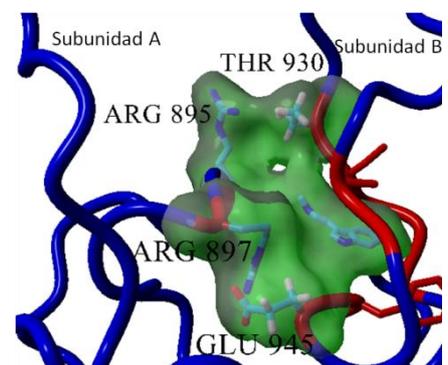


Figura 24. Estabilización de las subunidades

El residuo Lys856 importante para el sitio del mentol parece ser capaz de interactuar con un gran número de ligandos. Sin embargo, en la zona donde se encuentra, que corresponde al linker S4-S5, se observa un espacio vacío donde se podría posicionar cualquiera de los compuestos aquí estudiados. Este hecho junto

con las bajas energías de unión correspondientes a la interacción con este residuo hace sospechar que se trata de un falso positivo. A pesar de que dicha interacción pueda darse en algún caso concreto se necesitaría un estudio más profundo.

Finalmente, comparando las energías de unión de todos los ligandos en las diversas interacciones con alguno de los estados del canal se observa que casi la totalidad de ellas son mayores que la energía de unión del mentol que se ha tenido como referencia. Esto indica que en teoría casi cualquiera de las interacciones estudiadas tiene mayor probabilidad de suceder que la interacción con el mentol.

6. Conclusiones y proyección futura

En primer lugar, no hay que olvidar que el cribado virtual es una herramienta como muchas otras, que nos ayuda en el estudio y búsqueda de nuevos moduladores, sin embargo no es sustitutiva de las técnicas de laboratorio húmedo e incluso a veces pueden existir discrepancias con ellas, sobre todo a la hora de trabajar con modelos de proteínas y no estructuras reales como es el caso.

Los resultados obtenidos indican que existen preferencias de algunos tipos de ligando por un sitio de unión de entre los considerados en este trabajo, en concreto, el del mentol, la icilina y los giros extracelulares. Aunque no existan pruebas experimentales y/o bibliográficas hasta el momento, parece factible el hecho de que algunos compuestos puedan interaccionar con residuos de los giros extracelulares tal y como se sospechaba. Sin embargo, este es solo un primer paso en el estudio de gran parte de dichos compuestos, por lo que haría falta profundizar más en él y entender los mecanismos a través de los cuales se podría modular el canal TRPM8. Una vez que existen evidencias de la interacción de los ligandos con diversos sitios del canal, habría que estudiar la función que tienen éstos, es decir, si son agonistas o antagonistas a través de estudios de electrofisiología, por ejemplo. Habría que observar el comportamiento del canal en presencia de los efectores en distintas condiciones de temperatura, concentración de mentol e icilina y voltaje para entender mejor la función de cada ligando además de su competitividad por un sitio de unión concreto.

7. Bibliografía

- Bandell M, Dubin A.E, Petrus M.J, Orth A, Mathur J, Hwang S.W (2006) High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol A, *Nat. Neurosci.* 9 493-500
- Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D (2013) TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms, *Nature* 12823
- DeFalco J, Steiger D, Dourado M, Emerling D, Duncton MA (2010) 5-Benzyloxytryptamine as an antagonist of TRPM8. *Bioorg Med Chem Lett* 20:7076-7079
- Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Zhang W, Yang R, Cieplak P, Luo R and Lee T (2003), A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins, *J.Comput.Chem.* 24, 1999-2012
- Jan-Albert Manenschiijn, Tesis Doctoral, Pharmacological modulation of the native and recombinant thermosensitive ion channel Transient Receptor Potential Melastatin 8, 2014, que se puede encontrar en <https://www.educacion.es/teseo/mostrarRef.do?ref=1101906>
- Konagurthu AS, Whisstock JC, Stuckey PJ, Lesk AM (2006), MUSTANG: A multiple structural alignment algorithm, *Proteins* 64, 559-574
- Malkia A, Pertusa M, Ballester G.F, Montiel A.F, Viana F (2009) Differential role of the menthol-binding residue Y745 in the antagonism of thermally gated TRPM8 channels, *Molecular Pain* 5:62
- Molecular Modeling. H.-D Höltje, W. Sippl, D. Rognan, G. Folkers; WILEY-VCH, 2008, Chapter 2 (Small Molecules), Chapter 4 (Introduction to Comparative Protein Modeling), Chapter 5 (Virtual Screening and Docking)
- Nilius B, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, Wang C, Zhu M.X, Voets T (2005) Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of the nonselective ion channel TRPM4, *J. Biol. Chem* 859-869
- Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y (2013) Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy, *Nature* 12822
- Pedretti A, Marconi C, Bettinelli I, Vistoli G (2009) Comparative modeling of the quaternary structure for the human TRPM8 channel and analysis of its binding features, Elsevier B.V
- Voets T, Owsianik G, Janssens A, Talavera K, Nilius B, (2007) TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli, *Nat Chem Biol* 3:174-182

Anexos

Anexo 1.

Alineamiento entre secuencias proteicas de TRPM8 de rata y TRPM8 en estado abierto.

```
#####
Program: needle
Rundate: Mon 16 Mar 2015 11:40:41
Commandline: needle
  -auto
  -stdout
  -asequence emboss_needle-E20150316-114040-0229-41678241-pg.aupfile
  -bsequence emboss_needle-E20150316-114040-0229-41678241-pg.bupfile
  -datafile EBLOSUM62
  -gapopen 10.0
  -gapextend 0.5
  -endopen 10.0
  -endextend 0.5
  -aformat3 pair
  -sprotein1
  -sprotein2
Align_format: pair
Report_file: stdout
#####

=====

Aligned_sequences: 2
1: TRPM8opened+loop
2: TRPM8_RAT
Matrix: EBLOSUM62
Gap_penalty: 10.0
Extend_penalty: 0.5

Length: 1104
Identity: 554/1104 (50.2%)
Similarity: 554/1104 (50.2%)
Gaps: 550/1104 (49.8%)
Score: 2931.0

TRPM8opened+1 1 ----- 0
TRPM8_RAT 1 MSFEGARLSMRSRRNGTLGSTRITLYSSVSRSTDVSYSESDLVNFIQANFK 50
TRPM8opened+1 1 ----- 0
TRPM8_RAT 51 KRECVFFTRDSKAMESICKCGYASQHIIEGTQINQNEKWNYYKHTKEFPT 100
TRPM8opened+1 1 ----- 0
TRPM8_RAT 101 DAFGDIQFETLGKKGKYLRLSCDTDSETLYELLTQHWHLKTPNLVISVTG 150
TRPM8opened+1 1 ----- 0
TRPM8_RAT 151 GAKNFALKPRMRKIFSRLIYIAQSKGAWILTTGGTHYGLMKYIGEVVRDNT 200
TRPM8opened+1 1 ----- 0
TRPM8_RAT 201 ISRNSEENIVAIGIAAWGMVSNRDTLIRNCDEGHFSAQYIMDDFMRDPL 250
TRPM8opened+1 1 ----- 0
TRPM8_RAT 251 YILDNNHTHLLLDVNGCHGHPTVEAKLRNQLKRYISERTSQDSNYGGKIP 300
TRPM8opened+1 1 ----- 0
TRPM8_RAT 301 IVCFAQGGGRETALKAINTSVKSKIPCVVVEGSGQIADVIALVEVEDVLT 350
TRPM8opened+1 1 ----- 0
TRPM8_RAT 351 SSMVKEKLVRFPLRTVSRLEPEEEIESWIKWLKEILESPHLLTVIRMEEAG 400
TRPM8opened+1 1 ----- 0
TRPM8_RAT 401 DEVSSAISYALYKAFSTNEQDKDNWNGQLKLLLEWNQLDLASDEIFTND 450
```

TRPM8opened	1	-----FTALIKDRPKFVRLFLENGLNQKFLTNEVLTELFSTH	38
TRPM8_RAT	451	RRWESADLQEVMTALIKDRPKFVRLFLENGLNQKFLTNEVLTELFSTH	500
TRPM8opened	39	FSTLVYRNQIAKNSYNDALLTFVWKLVANFRRSFWKEDRSSREDLDVEL	88
TRPM8_RAT	501	FSTLVYRNQIAKNSYNDALLTFVWKLVANFRRSFWKEDRSSREDLDVEL	550
TRPM8opened	89	HDASLTTRHPLQALFIWAILQNKKELSKVIWEQTKGCTLAALGASKLLKT	138
TRPM8_RAT	551	HDASLTTRHPLQALFIWAILQNKKELSKVIWEQTKGCTLAALGASKLLKT	600
TRPM8opened	139	LAKVKNDINAAGESEELANEYETRAVELFTECYSSDEDLAEQLLVYSCEA	188
TRPM8_RAT	601	LAKVKNDINAAGESEELANEYETRAVELFTECYSSDEDLAEQLLVYSCEA	650
TRPM8opened	189	WGGSNCLELAVEATDQHFIAQPGVQNFSLKQWYGEISRDTKNWKIILCLF	238
TRPM8_RAT	651	WGGSNCLELAVEATDQHFIAQPGVQNFSLKQWYGEISRDTKNWKIILCLF	700
TRPM8opened	239	IIPLVGCGLVSRKPKPIDKHKLLWYVAFFTSPFVVFVSWNVVFIYAFLL	288
TRPM8_RAT	701	IIPLVGCGLVSRKPKPIDKHKLLWYVAFFTSPFVVFVSWNVVFIYAFLL	750
TRPM8opened	289	LFAYVLLMDFHVPHTPELILYALVFLFCDEVQRQWYMNQVNYFTDLWNV	338
TRPM8_RAT	751	LFAYVLLMDFHVPHTPELILYALVFLFCDEVQRQWYMNQVNYFTDLWNV	800
TRPM8opened	339	MDTLGLFYFIAGIVFRLHSSNKSSLYSGRVI FCLDYIIFTLRLIHIFTVS	388
TRPM8_RAT	801	MDTLGLFYFIAGIVFRLHSSNKSSLYSGRVI FCLDYIIFTLRLIHIFTVS	850
TRPM8opened	389	RNLGPKIIMLQRLIDVFFFLFLFAVVMVAFGVARQGILRQNEQRWRWIF	438
TRPM8_RAT	851	RNLGPKIIMLQRLIDVFFFLFLFAVVMVAFGVARQGILRQNEQRWRWIF	900
TRPM8opened	439	RSVIYEPYLAMFGQVPSDVDSTTYDFSHCTFSGNESKPLCVLDEYNLPR	488
TRPM8_RAT	901	RSVIYEPYLAMFGQVPSDVDSTTYDFSHCTFSGNESKPLCVLDEYNLPR	950
TRPM8opened	489	FPEWITIPLVCIYMLSTNILLVNLVAMFGYTVGIVQENNDQVWKQRYF	538
TRPM8_RAT	951	FPEWITIPLVCIYMLSTNILLVNLVAMFGYTVGIVQENNDQVWKQRYF	1000
TRPM8opened	539	LVQEYCNRLNIPPFV-----	554
TRPM8_RAT	1001	LVQEYCNRLNIPPFVVFAYFYMVVKKCFKCCCKEKNTESSACCFRNEFN	1050

El modelo comprende a los residuos 463 hasta 1116 de la proteína original que tiene un tamaño de 1050 aminoácidos.

Anexo 2.

Macro "dock_run.mcr" para ejecución de cribado virtual global.

```
# YASARA MACRO
# TOPIC:      5. Structure prediction
# TITLE:     Docking a ligand to a receptor
# REQUIRES:  Structure
# AUTHOR:    Elmar Krieger
# LICENSE:   GPL
# DESCRIPTION: This macro predicts the structure of a ligand-receptor complex. It can also continue
# a docking run that got interrupted.
# An analysis log file is written at the end.

# Parameter section - adjust as needed, but NOTE that some changes only take effect
# if you start an entirely new docking job, not if you continue an existing one.
# =====

# You can either set the target structure by clicking on Options > Macro > Set target,
# or by uncommenting the line below and specifying it directly.
MacroTarget='/home/myname/projects/docking/lsdf'

# Docking method, either AutoDockLGA or VINA
method='VINA'

# Number of docking runs (maximally 999, each run can take up to an hour)
runs=25

# Docking results usually cluster around certain hot spot conformations,
# and the lowest energy complex in each cluster is saved. Two complexes belong to
# different clusters if the ligand RMSD is larger than this minimum [A]:
rmsdmin=5.0

# Set to 1 to keep the ligand completely rigid (alternatively you can provide
# the ligand as a *.yob file and fix certain dihedral angles only).
rigid=0

# A selection of receptor residues to keep flexible, e.g. flexres = 'Lys 91 Leu 100',
# or (if the receptor is not a monomer) flexres = 'Res Lys 91 Mol A or Res Leu 100 Mol B'.
# Alternatively you can provide the receptor as a *.sce or *.yob file with fixed
# atoms, which gives better control (e.g. you can keep only part of a side-chain
# or even a terminal backbone flexible).
flexres=''

# Set to 1 to calculate the binding energy spread in each cluster (takes longer)
calcspread=1

# Force field used for charge assignment, not used by VINA.
ForceField AMBER03

# Normally no change required below this point
# =====

# Sanity checks
if MacroTarget==' '
  RaiseError "This macro requires a target. Either edit the macro file or click Options > Macro >
  Set target to choose a target structure"
if runs>999
  RaiseError 'Too many docking runs selected, (runs) would take forever'

structlist='receptor','ligand'

# Load receptor and ligand
Clear
# Do we already have a receptor scene?
scefilename=(MacroTarget)_receptor.sce'
scene = FileSize (scefilename)
if !scene
  # No, load PDB or YOB files of receptor and ligand
  for struct in structlist
    (struct)=0
    for type in 'yob','pdb'
      filename=(MacroTarget)_ (struct). (type)'
      exists = FileSize (filename)
      if exists
        (struct) = Load(type) (filename)
        break
    if not (struct)
```

```

        RaiseError 'The (struct) was not found at (filename). Please follow the instructions in the
"Recipes" section exactly, especially when setting
the macro target'
# Orient the receptor, create a docking cell that includes the entire receptor
# and also has enough empty space around to accommodate the ligand (which has to
# be removed temporarily, since 'Cell Auto' encloses the entire soup).
ligandradius = RadiusObj (ligand)
NiceOriObj (receptor)
RemoveObj (ligand)
Cell Auto,Extension=(ligandradius*2)
AddObj (ligand)
else
# Yes, a scene is present
LoadSce (scefilename)
# Verify that the cell is present
simcell = CountObj SimCell
if !simcell
    RaiseError 'If you provide a scene, it must contain a simulation cell, but none was found in
(scefilename)'
# The receptor is the object containing the first atom
receptor = ListObj Atom 1
if Objects>2
    ShowMessage 'Your scene contains (Objects) objects, while only the receptor and the docking cell are
expected.'
    Wait ContinueButton
    HideMessage
# Load the ligand
ligand=0
for type in 'yob','pdb'
    filename=(MacroTarget)_ligand.(type)
    exists = FileSize (filename)
    if exists
        ligand = Load(type) (filename)
        break
if not ligand
    RaiseError 'The ligand was not found at (filename)'
ligandradius = RadiusObj (ligand)
# Warn if the cell is too large
x,y,z = Cell
if x>96 or y>96 or z>96
    ShowMessage "A cell axis is longer than 96 A, which may reduce docking accuracy.
Consider focusing on the active site."
    Wait ContinueButton
    HideMessage
# Rename receptor and ligand objects to make sure they can be identified later
NameObj (receptor),Receptor
NameObj (ligand),Ligand
# Keep selected side-chains flexible
if flexres!=''
    FixObj Receptor
    FreeAtom Res (flexres) and Sidechain Obj Receptor
    FixRes Cys Atom SG with bond to Atom SG or Ala Pro and Obj Receptor
# The segment name C*** is used to tag ligand Conformations, and cannot be used for
the receptor
hit = ListAtom Segment C??? Obj Receptor
if hit
    MarkAtom (hit)
    segname = SegAtom (hit)
    RaiseError 'Segment names starting with "C" are unfortunately reserved to identify
ligand conformations, please click "Edit > Rename > Segment"
to rename the receptor segment "(segname)'"
# Docking is done without periodic boundaries
Boundary Wall
Longrange None
# Do not show secondary structure for protein ligands, this slows things down
HideSecStrObj Ligand
ShowObj Ligand
StickObj Ligand
# Move the ligand out of the cell, so that it does not block the view
cellpos() = PosObj SimCell
PosObj (ligand), (cellpos1), (cellpos2+y*0.5+ligandradius), (cellpos3)
# Perform rigid docking if requested
if rigid
    FixObj Ligand

```



```

LoadSce (MacroTarget)
JoinObj RecepFlex,Ligand
for i=001 to clusters
  # Collect the binding energies of all poses that belong to the current cluster
  ShowMessage 'Calculating energy spread, (100*i/clusters)% completed...'
  Wait 1
  bindnrlist()=0
  lastbindnrg=-1e99
  members=0
  for j=001 to runs
    if !count assigned(j)
      r = RMSDAtom Segment C(j),Segment (segnamelist(i))
      if r<rmsdmin
        # Found a member of this cluster
        bindnrg = BFactorAtom Segment C(j)
        if bindnrg!=lastbindnrg
          # Not a duplicate pose
          members=members+1
          bindnrlist(members)=bindnrg
          lastbindnrg=bindnrg
          assigned(j)=1
        # Print the spread
        print '(000+i) | (000+members) | (000000.0000+mean bindnrlist)+(000000.0000+stddev bindnrlist)'
      print
      print 'The results of the (runs) runs have been combined in a single scene at (MacroTarget).sce',Convert=No
      print 'The (clusters) clusters have been saved as:'
      LoadSce (MacroTarget)
      for i=001 to clusters
        print '(MacroTarget)_(i).yob',Convert=No
      StopLog
      HideMessage
      Console On
      # Exit YASARA if this macro was provided as command line argument in console mode
      if runWithMacro and ConsoleMode
        Exit

# EXTRACT DOCKING RESULT
# Returns a result string and binding energy, extracted from atomic BFactor and Property.
# 'num' is a sequential number, 'rechsel' selects the receptor, 'ligsel' the ligand.
def DockingResult num,rechsel,ligsel
  # Get the binding energy from the B-factor...
  bindnrg = BFactorAtom (ligsel)
  # ...and the dissociation constant from the atomic property.
  disscnst = PropAtom (ligsel)
  if bindnrg<=0
    disscnst='          None'
  else
    disscnst= 00000000000000.0000+disscnst
  # Get receptor residues that contact the ligand
  reslist() = ListRes (rechsel) with distance<4.0 from (ligsel),Format='RESNAME MOLNAME RESNUM'
  if !count reslist
    reslist='No residues in contact'
  else
    reslist=join reslist
  result='(000+num) | (000000.0000+bindnrg) | (disscnst) | (reslist)'
  return result

```

Anexo 3.

Script para análisis estadístico.

```
# -*- coding: cp1252 -*-
#Analiza los archivos *.log de experimentos de docking
#OUTPUT: out_residuos.txt y out_statistic.txt
import os
main_path='E:/pitufo/varios/Belmonte/hialuronico/docking/TRPA1/846_50/'
if not os.path.exists(main_path+'out_analysis/'):os.mkdir(main_path+'out_analysis/')
out_path=main_path+'out_analysis/'
contenido=os.walk(main_path)
out=open(out_path+'out_residuos.txt','w',0)
out2=open(out_path+'out_statistic.txt','w',0)
out3=open(out_path+'out_energies.txt','w',0)
out4=open(out_path+'out_best_energies.txt','w',0)
out4.write('Lista global de ligandos y energias\n\n')
for root,ds,fs in contenido:#Barre todo el espacio de raiz, directorios y archivos
    root=root+'/'
    #print root#Barre las ruta actual
    #for d in ds:#Barre los directorios
        #print root,d
    for fileinput in fs:#Barre los archivos
        if fileinput.endswith('.log') and not fileinput.startswith('autodock'):
            lines=open(root+fileinput,'r').readlines()
            out.write('***** RESULTADOS DEL DOCKING DE %s%s *****\n'%(main_path,fileinput))
            out2.write('***** RESULTADOS DEL DOCKING DE %s%s *****\n'%(main_path,fileinput))
            out.write('<== Analisis de los sitios de interaccion del Ligando con el Receptor ==>\n')
            out2.write('<== Analisis de los sitios de interaccion del Ligando con el Receptor ==>\n')
            for tipos in ['Run','Clu']:
                dataraw=[];data=[];cluster=False;stop=False;cont=0;agrupar=[];agrupar2=[]
                #out.write('***** RESULTADOS DEL DOCKING DE %s%s *****\n'%(main_path,fileinput))
                for line in lines:
                    estrin=line.replace('PEA ', 'PEA X')#Si hay lipidos, añadir CHAIN como X
                    line=estrin
                    estrin=line.replace('No residues in contact', 'PEA X 1')
                    line=estrin
                    linesplit=line.split('|')
                    if linesplit[0].strip()==tipos:
                        cluster=True#Localiza cuando empieza el cluster
                        #print linesplit,tipos,coco
                    if cluster==True:
                        if linesplit[0]=='\n':stop=True#localiza cuando acaba el cluster
                        if stop<>True:
                            dataraw.append(linesplit)
                            cont+=1
                yob=cont-2 #Yob son cont-2
                out.write('\nTIPO: %s con %s ensayos\n'%(tipos,yob))
                out2.write('\nTIPO: %s con %s ensayos\n'%(tipos,yob))
                #dataraw es matriz de matrices raw con 4 columnas. Vamos a refinar
                #['001 ', ' ', ' 000005.8000 ', ' 0000056160000.0000 ', ' ASN D 217 ILE D 220 PRO D 221 CYS
                D 222 LEU D 224 PHE D 225 LEU D 228 LEU D 253 PHE D 256 LEU D 257 ILE D 260 THR E 263 ILE E 264 LEU
                E 266 PHE E 267 ILE E 269 ALA E 270 SER E 294 ILE E 297 VAL E 298\n']
                del dataraw[1];cont=0
                for clus in dataraw:#Extrae los datos y los mete de matriz de matrices data
                    cont+=1;new=[]
                    if cont==1:
                        for f in clus:
                            f=f.strip()
                            new.append(f)
                            data.append(new)
                    else:
                        campo1=clus[0].strip();new.append(campo1)
                        campo2=float(clus[1].strip());new.append(campo2)
                        if clus[2].strip()!='None':
                            campo3=float(clus[2].strip());new.append(campo3)
                        else:
                            campo3=clus[2].strip();new.append(campo3)
                        campo4=clus[3].strip().split()
                        campo41=[];campo42=[];campo43=[]#Lista de RES, CHAIN, POS
                        for f in range (0,len(campo4),3):
                            campo41.append(campo4[f])#Lista de RES
                        for f in range (1,len(campo4),3):
                            campo42.append(campo4[f])#Lista de CHAIN
                        for f in range (2,len(campo4),3):
                            campo43.append(campo4[f])#Lista de POS
                        new.append(campo41);new.append(campo42);new.append(campo43)
                        #print new
```

```

data.append(new)
#data son== ['081', 2.8799999999999999, 7689999872.0, ['ILE', 'LEU', 'PHE', 'TYR', 'PHE',
'VAL', 'SER', 'ILE', 'PHE', 'SER', 'LEU'], ['B', 'B', 'B', 'B', 'B', 'B', 'B', 'B', 'B', 'B',
'B', 'B'], ['289', '290', '293', '441', '444', '445', '448', '449', '452', '453', '456']]
cont=-1;temp=[];dict1={}
for clasi in data:#Clasificar los datos
    cont+=1
    if cont>0:
        Set1=len(set(clasi[4]))#Indica con cuantas cadenas interactua
temp.append([cont,Set1])#temp matriz tiene las posiciones y las cadenas afectadas
if tipos=='Cluster':
    agrupar.append([Set1,list(set(clasi[4])),clasi[3],clasi[4],clasi[5]])#Para agrupar las
posiciones de los clusters. Para estadística
#formato [2, ['E', 'D'], ['ASN', 'ILE', 'PRO', 'CYS', 'LEU', 'PHE', 'LEU', 'LEU', 'PHE',
'LEU', 'ILE', 'THR', 'ILE', 'LEU', 'PHE', 'ILE', 'ALA', 'SER', 'ILE', 'VAL'], ['D', 'D',
'D', 'D', 'D', 'D', 'D', 'D', 'D', 'E', 'E'],
['217', '220', '221', '222', '224', '225', '228', '253', '256', '257', '260', '263', '264',
'266', '267', '269', '270', '294', '297', '298']]
if tipos=='Cluster':#Para estadística
    for f in agrupar:#Barre agrupar para cambiar el formato de los residuos afectados
residues=[]
    for g in range(0,len(f[2])):
        residues.append(f[2][g]+f[3][g]+f[4][g])
    agrupar2.append([f[0],f[1],residues])
#formato [2, ['E', 'D'], ['ASND217', 'ILED220', 'PROD221', 'CYS222', 'LEUD224', 'PHED225',
'LEUD228', 'LEUD253', 'PHED256', 'LEUD257', 'ILED260', 'THRE263', 'ILEE264', 'LEUE266', 'PHEE267',
'ILEE269', 'ALAE270', 'SERE294', 'ILEE297', 'VALE298']]
    agrupar=agrupar2
cont=0
for f in temp:
    cont+=1
    dict1[f[1]]=cont#cont no vale para nada
#Se calcula el numero de cadenas diferentes: {1: 81, 2: 80, 4: 17, 5: 24}
for keys in dict1:#Se barre el numero de veces del diccionario
    out.write('\n** Ligando interactua con %s cadenas **'%(keys)+'\n\n')
    out2.write('\n** Ligando interactua con %s cadenas **'%(keys)+'\n\n')
    cont=0
    for g in temp:#se barren los datos
        if g[1]==keys:
            cont+=1
            valor=data[g[0]]#captura el valor que cumple las condiciones
            #valor=['004', 5.0, 217300000.0, ['TYR', 'VAL', 'PHE', 'ILE', 'PRO', 'CYS',
'ILE', 'LEU', 'THR', 'LEU', 'TYR', 'PHE', 'ILE', 'LEU', 'VAL', 'VAL', 'PHE'],
['C', 'C', 'C'],
['228', '229', '232', '233', '235', '236', '239', '271', '274', '278', '291',
'294', '295', '298', '299', '302', '471']]
            out.write('\tComplejo= %s'%(valor[0])+'\n')
            Set1=set(valor[4])#da las cadenas diferentes para este objeto
            for h in Set1:#Barre las cadenas
                new=[]
                out.write('\t\tCadena %s: %s'%(h))
                for i in range(0,len(valor[4])):#Barre las cadenas
                    if valor[4][i]==h:#SI hay coincidencia...
                        #print valor
                        new.append(valor[3][i]+valor[5][i])#Almacena residuo y posición por esa cadena
                out.write('\t\t'.join(new)+'\n')
            out.write('\n\t\tTOTAL= %s/%s complejos (%s%%)\n\n'%(cont,yob,(cont*100/yob))
            out2.write('\n\t\tTOTAL= %s/%s complejos (%s%%)\n\n'%(cont,yob,(cont*100/yob))
#Extracción y presentación de datos de energía a partir de los CLUSTER
if tipos=='Cluster':
    temp=[];agrupa_dict={};cuenta_dict={}
    for f in agrupar:#Barrido doble de agrupar para clustering de posiciones y residuos
        #count1+=1
        #count2=0
        for g in agrupar:
            if f[1]==g[1]:#Compara si hay mas complejos que interactuen con 1, con 2, etc o con las que sean, y los agrupa
                #count2+=1
                #count1=1
                if tuple(f[1]) not in agrupa_dict:
                    agrupa_dict[tuple(f[1])]=[]#Asigna valor de lista para evitar error la primera vez
                    cuenta_dict[tuple(f[1])]=1#Asigna valor 1 a la cuenta de esa tupla. Restamos las comparaciones con signo mismo
                else:
                    cuenta_dict[tuple(f[1])]=cuenta_dict[tuple(f[1])]+1#Cuenta las veces que se repite cada interacción con las cadenas
                    agrupa_dict[tuple(f[1])]=agrupa_dict[tuple(f[1])]+f[2]+g[2]#Suma listas de coincidencias y las asigna/reasigna al diccionario

```

```

for keys in cuenta_dict:# formato (('A,'): 9, ('E', 'D'): 8, ('C,'): 9, ('A', 'C', 'B', 'E', 'D'): 1, ('B,'): 9,
('E,'): 6, ('A', 'C', 'E', 'D'): 2, ('D,'): 9, ('C', 'B'): 6, ('A', 'E'): 2, ('C', 'D'): 8, ('A', 'C', 'B',
'D'): 1, ('A', 'B'): 11)
cuenta_dict[keys]=int((cuenta_dict[keys])**0.5)
#print agrupa_dict[('A','E')],coco
out.write('\nCadenas agrupadas y residuos acumulados que interactonan con el ligando+'\n\n')
out2.write('\nCadenas agrupadas y residuos acumulados que interactonan con el ligando+'\n\n')
for keys in agrupa_dict:#Barre el diccionario para añadir datos a estadística. Formato (('A,'): ['LEUA223',
'SERA226', 'PHEA227', 'THRA229', 'GLYA230', 'PHEA233', 'TYRA234', 'LEUA410', 'VALA413', 'PHEA414', 'ILEA417',
'CYSA418', 'LEUA223', 'SERA226', 'PHEA227', 'THRA229',...
no_redun=set(agrupa_dict[keys])#Elimina posiciones repetidas
out.write('\n**Interacciones con cadenas '+'-'.join(keys)+' '+str(cuenta_dict[keys])/'+str(yob)+'
('+str(cuenta_dict[keys]*100/yob)+'%)'\n')
out2.write('\n**Interacciones con cadenas '+'-'.join(keys)+' '+str(cuenta_dict[keys])/'+str(yob)+'
('+str(cuenta_dict[keys]*100/yob)+'%)'\n')
#out.write('\tResiduos totales (+multiplicados): '+str(len(agrupa_dict[keys]))+'\n')
out.write('\tResiduos (no redundantes): '+str(len(no_redun))+'\n\n')
out2.write('\tResiduos (no redundantes): '+str(len(no_redun))+'\n\n')
chain_dict={}
for f in no_redun:#Se hace así para imprimir las cadenas por separado, no en una línea
chain=f[3:4]
if chain not in chain_dict:#Diccionario que contiene las cadenas y los residuos correspondientes
chain_dict[chain]=[]
chain_dict[chain]=chain_dict[chain]+[f]
for keys in chain_dict:
out.write('\t\t'+keys+'> '+','.join(chain_dict[keys])+'\n')
out3.write('\tResumen de energía de binding del ligando %s\n'%(fileinput))
for clasi in data:
if clasi[1]=='Bind.energy[kcal/mol]':
out3.write(clasi[0]+' \t'+clasi[1]+' \n')
else:
out3.write(clasi[0]+' \t'+str("%.3f"%float(clasi[1]))+' \n')
out3.write('\n')
out4.write(fileinput+' \t'+str("%.3f"%float(data[1][1]))+' \n')

out.close()
out2.close()
out3.close()
out4.close()
#break

```



Anexo 4.

Script para búsqueda de interacciones en zonas de interés ya conocidas.

```
***** Gregorio *****
***** 3 December 2012 *****
# Dockin selection by proximity *****
*****
# Define unos criterios de proximidad del ligando
# a un residuo o grupo de residuos.
# Carga todos los yob y decide si el ligando UNK esta
# lo suficientemente cerca y si no es asi lo descarta
# Si esta cerca elimina la proteina y deja el ligando
# Finalmente graba un archivo con los nombres de los yob
# seleccionaados
*****
#Limpieza
Clear
#Define el Target
MacroTarget='E:\pitufo\varios\Belmonte\hialuronico\Belmonte\799\799'
# load YOB files of receptor and ligand.
# Criterios de busqueda. Puede ser Res UNK o Mol
ligando='UNK'
#En A
distancia=3.5
#Un residuo o conjunto de residuos: '257-265' o 'Lys Arg Tyr'==> '535-538' '613-618'
residuos='613-618'
#Un nombre para el ensayo si hay que hacer muchos distintos
nombre_ensayo='S5'
*****
#Calcula el numero de yob que hay en el folder
cluster=0
for i=001 to 999
  filename=(MacroTarget)_ (i).yob'
  exists = FileSize (filename)
  if exists
    cluster=cluster+1
  else
    break
print (cluster)
#Barra los yob en busca de los criterios =====
position=2
for j=001 to cluster
  filename=(MacroTarget)_ (j).yob'
  #Load YOB
  LoadYOB (filename)
  #CRITERIO DE BUSQUEDA: Cercania a M2 (259-277). Siempre en el Obj 1
  proximity=CountRes (ligando) Obj 1 with distance < (distancia) from Res (residuos)
  if proximity==0
    DelObj 1
  else
    #Cambiar el objeto y eliminar las cadenas repetidas
    RenumberObj 1, (position)
    if (position)>2
      DelMol A B C D X Obj (position)
      position=position+1
Style Ribbon
RenumberObj All
ZoomAll
CenterAll
ColorMol A B C D E,Blue,second=Yellow,Segments=No
StickMol _
#ColorRes 259-277,green
ShowSurfMol _ ,Type=Molecular,Update=Dynamic,Specular=Yes
#ColorRes 228-252,cyan
HideAtom Element H
Console Off
RecordLog '(MacroTarget)_ (nombre_ensayo)_ lista_yobs.txt'
pwd
print distance=(distancia) of ligand (ligando) to residues (residuos)
ListObj Res (ligando)
StopLog
Console On
SaveSce '(MacroTarget)_ (nombre_ensayo)_ lista_yobs.sce'
```