



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctora en Física

Estudio computacional del receptor $GABA_A \alpha_1\beta_2\gamma_2$ y su interacción con moléculas de interés biológico en el sitio de unión de benzodiazepinas

María Julia Amundarain

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctora en Física

**Estudio computacional del receptor $GABA_A \alpha_1\beta_2\gamma_2$ y
su interacción con moléculas de interés biológico en el
sitio de unión de benzodiazepinas**

María Julia Amundarain

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2018

Prefacio

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Física, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Grupo de Biofísica, dependiente del Departamento de Física durante el período comprendido entre el 12 de agosto de 2014 y diciembre de 2018, bajo la dirección del Dr. Marcelo D. Costabel, Profesor Asociado del Departamento de Física, de la materia Laboratorio I.”

María Julia Amundarain

Bahía Blanca, diciembre de 2018

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaria General de Posgrado
y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .../.../... , mereciendo la calificación de (.....)

Agradecimientos

A la Universidad Nacional del Sur y al IFISUR por el lugar de trabajo, los recursos y la formación durante los últimos doce años.

A CONICET por permitirme trabajar en esta tesis a tiempo completo.

A Marcelo Costabel por abrirme las puertas al mundo de la biofísica.

A mis compañeros de grupo Omar, Diego y muy especialmente a Fer y Néstor por toda su ayuda, los consejos y por escucharme siempre.

A Ernesto y los meninos de la Fiocruz por recibirme en Río.

A Alejandro Giorgetti, por la infinita ayuda sin la cual esta tesis no existiría.

A Maca y Ceci, por compartir los congresos y el amor por la biofísica.

A Licho, Pau, Cris y Duilio por ayudarme a abrazar mi lado nerd.

A Juan por todo el camino recorrido juntos.

A Sofi, Maca y Lud por estar siempre al lado mío, aunque a la distancia, desde siempre.

A Queen, porque el arte sana y salva.

A mi familia: mis primas, mis tías y tíos, por su compañía y todo lo que me enseñan a diario. A Choly y Nora por estar siempre presentes cuidándome.

A Pupi y Txiky.

A mis papás, Gloria y Sergio por darme todo y más. Nada de esto sería posible sin ellos.

A Ro, salvadora de vida y ballenas, porque es mi suerte tenerla de hermana.

A Bruno, por ser el mejor compañero que existe. Por sostenerme y levantarme cada vez que no podía sola.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Dr. Marcelo Daniel Costabel

Resumen

Los receptores GABA_A son canales iónicos activados por ligandos y funcionan como los principales mediadores de la inhibición en el sistema nervioso central de mamíferos. Están formados por cinco subunidades formando un poro central conductor de iones. Cada combinación de subunidades presenta una función y localización determinada, de las cuales el subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ es el más abundante en el ser humano. Los receptores GABA_A intervienen en una miríada de procesos neurológicos y su desregulación genera las denominadas canalopatías. Por lo cual, el estudio de estos sistemas es indispensable para el desarrollo de fármacos y de tratamientos para mejorar la calidad de vida.

En este trabajo de tesis se propone el estudio *in silico* del receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ mediante el empleo de técnicas de bioinformática y biofísica computacional, que incluyen simulaciones de docking molecular, dinámica molecular y técnicas de muestreo avanzado.

Se desarrolló un modelo por homología del receptor empleando el receptor GABA_A homopentámero de subunidades β_3 . El modelo fue validado a través de un cuidadoso análisis de su estereoquímica y su estabilidad mediante simulaciones de dinámica molecular. A continuación, se realizó un exhaustivo análisis de la unión de compuestos a dos sitios de unión en el dominio extracelular del modelo: el sitio ortostérico (donde se unen los ligandos que actúan directamente sobre la activación del canal) y el sitio de unión de gran afinidad de las benzodiazepinas (moduladores alostéricos). Los modos de unión encontrados fueron contrastados con información experimental disponible y se halló muy buena concordancia. El trabajo finalizó con el primer estudio computacional sobre la interacción putativa entre este receptor y la proteína DBI y fragmentos peptídicos derivados de su digestión. Este análisis permitió elaborar, por primera vez, una hipótesis respecto a los residuos involucrados en la interacción.

Abstract

GABA_A receptors are pentameric ligand-gated ion channels which act as the main mediators of inhibitory signalling in the central nervous system of mammals. They are formed by five subunits arranged around a central ion-conducting pore. Each combination of subunits has a specific function and localization, the $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ subtype being the most abundant in *homo sapiens*. These receptors intervene in a myriad of neurological processes and their dysregulation cause several channelopathies. Although they are very complex systems, their study is fundamental for the development of new drugs and therapies aimed at improving life quality.

In this thesis we performed an *in silico* study of the $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABA_A receptor through the use of bioinformatics and computational biophysics tools, which include molecular docking, molecular dynamics and enhanced sampling techniques.

A homology model was developed using the structure of the GABA_A β_3 homopentamer. The model was validated through a thorough analysis of its stereochemistry and its stability was evaluated from molecular dynamics simulations. Moreover, an exhaustive evaluation of the binding modes of ligands to two extracellular sites was performed: the orthosteric site (ligands which act directly on the activation of the channel) and the high affinity binding site for benzodiazepines (allosteric modulators). The comparison of the binding modes to available experimental information showed great agreement. Finally, a computational study was carried out for the first time regarding the putative interaction of this receptor with DBI and its peptide fragments. This study allowed the formulation of the first hypotheses regarding the aminoacids involved in the interaction.

Tabla de abreviaturas

Abreviatura	Significado
AChBP	Acetylcholine Binding Protein
ACBP	Acyl-CoA Bindin Protein
ADV	AutoDock Vina
BZDs	Benzodiazepinas
DBI	Diazepam Binding Inhibitor
DM	Dinámica Molecular
ECD	Dominio Extracelular
ELIC	Erwinia ligand-gated ion channel
FF	Force Field (Campo de Fuerza)
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA _A Rs	Receptores del ácido γ -aminobutírico, tipo A
GLIC	Gloeobacter ligand-gated ion channel
i-BZDs	Imidazo-Benzodiazepinas
ICD	Dominio Intracelular
ODN	Octadecaneuropéptido
OP	Octaneuropéptido
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-phophatidylcholine
SCAM	Substituted cysteine accessibility method
SNC	Sistema Nervioso Central
TMD	Dominio Transmembrana

Índice general

Resumen	4
Abstract	5
Índice general	7
1. Introducción	11
1.1. Historia de esta tesis	11
1.2. Objeto de estudio: Proteínas	14
1.2.1. Proteínas de membrana	16
1.2.2. Interacción proteína-ligando	17
1.3. Receptores pLGICs y Cys-Loop	18
1.3.1. Breve historia de la determinación estructural de los pLGICs	21
1.4. Receptor GABA _A	24
1.4.1. Dominios	25
1.4.2. Funcionamiento	25
1.4.3. Sitio de unión ortostérico	26
1.4.4. Sitio de unión de las Benzodiazepinas	28
1.5. ACBP - DBI y su interacción con el receptor GABA _A	31
1.6. Objetivos	33
2. Metodología	34
2.1. Modelado por Homología	35
2.1.1. Búsqueda de proteínas homólogas y alineamiento inicial	36

2.1.2.	Alineamiento final	37
2.1.3.	Generación del modelo	39
2.1.4.	Evaluación del modelo	40
2.2.	Docking molecular	41
2.2.1.	Introducción	41
2.2.2.	AutoDock Vina	42
2.2.3.	HADDOCK	43
2.2.4.	Alcances del método	44
2.3.	Dinámica molecular	45
2.3.1.	Introducción	45
2.3.2.	Campo de Fuerzas	47
2.3.3.	Protocolo adoptado	49
2.3.4.	Algoritmos relacionados a la dinámica molecular	50
2.3.5.	Condiciones periódicas de borde (CPB)	54
2.3.6.	Búsqueda de primeros vecinos y descripción de las interacciones no enlazantes	55
2.3.7.	Control de la temperatura y la presión	57
2.4.	Herramientas de análisis	62
2.5.	Técnicas de muestreo avanzado	65
2.5.1.	Adaptive Biasing Force - ABF	66
3.	Parte I: Modelado del Receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$	69
3.1.	Objetivos	69
3.2.	Métodos	69
3.2.1.	Modelado por homología	69
3.2.2.	Modos Normales	71
3.2.3.	Simulaciones de dinámica molecular	71
3.3.	Resultados	74
3.3.1.	Desarrollo y evaluación del modelo	74
3.3.2.	Modos Normales	80

3.3.3.	Simulaciones de dinámica molecular	81
3.3.4.	Comparación con el receptor PDB ID: 6D6U	86
3.4.	Conclusiones	87
4.	Parte II - Interacción con ligandos	89
4.1.	Objetivos	89
4.2.	Métodos	89
4.2.1.	Docking Molecular	90
4.2.2.	Dinámica molecular	92
4.2.3.	ABF	93
4.3.	Resultados	95
4.3.1.	Sitio de unión ortostérico	95
4.3.2.	Sitio de unión de las benzodiazepinas	107
4.3.3.	Cálculo de la energía libre de unión	130
4.4.	Conclusiones	136
5.	Parte III - Interacción del receptor GABA_A con la proteína DBI y sus fragmentos peptídicos	142
5.1.	Objetivos	142
5.2.	Métodos	142
5.2.1.	Interacción con fragmentos peptídicos derivados de ODN	143
5.2.2.	Interacción ODN - receptor GABA _A	144
5.2.3.	Interacción DBI - receptor GABA _A	145
5.2.4.	Interacción DBI - Diazepam	145
5.3.	Resultados	146
5.3.1.	Interacción con fragmentos peptídicos derivados de ODN	146
5.3.2.	Interacción ODN - receptor GABA _A	150
5.3.3.	Interacción DBI - receptor GABA _A	154
5.3.4.	Interacción DBI - Diazepam	159
5.4.	Conclusiones	161

6. Conclusiones	163
6.1. Conclusiones generales	163
6.2. Conclusiones particulares	165
6.3. Perspectivas a Futuro	166
A. Compilación de la información experimental sobre la unión de ligandos a los sitios de unión estudiados	167
Bibliografía	177
Publicaciones	202

Capítulo 1

Introducción

1.1. Historia de esta tesis

La motivación inicial para realizar este trabajo de tesis fue el estudio de la interacción entre el receptor GABA_A del subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con la proteína DBI o *Diazepam Binding Inhibitor*. Estudios experimentales demostraron que tanto DBI como péptidos derivados de su digestión son secretados por astrocitos en distintas regiones del cerebro. Allí esta proteína y sus fragmentos peptídicos actúan como moduladores alostéricos endógenos de distintos subtipos de receptores GABA_A a través del sitio de unión de gran afinidad de las benzodiazepinas. Estos estudios revelaron que en ciertos casos la modulación es positiva, mientras que en otros casos es negativa. Así mismo, no lograron explicar el porqué de esta diferencia. En consecuencia, la motivación inicial para desarrollar la presente tesis fue intentar descubrir cuál es el fenómeno o la característica estructural que determina cada tipo de acción.

A principios de 2014, si bien había estructuras experimentales publicadas de DBI, no existían aún estructuras de receptores GABA_A. Por este motivo, el primer paso fue conseguir un modelo del subtipo más común en humano, el $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. Hasta ese momento el modelo más reciente estaba basado en la estructura del receptor de Glutamato, un homólogo perteneciente a *Caenorhabditis elegans*, en combinación con receptores procarióticos [1]. De esta manera comenzamos los primeros estudios, que se enfocaron en el aspecto electrostático sin obtener resultados concluyentes. En junio de 2014 se publicó la primera estructura cristalográfica de un receptor GABA_A, el homopentámero de subunidades β_3 [2]. Ante esta estructura, que

comparte una identidad de secuencia muy elevada con algunas de las subunidades del subtipo de interés, nos propusimos realizar un modelo propio basado en la nueva estructura.

A partir de ese momento, el foco de la tesis cambió a modelar el receptor de la manera más detallada posible. Analizamos en primer lugar los programas computacionales y servidores web que realizan la búsqueda de homólogos, el alineamiento de secuencias y finalmente el modelado. El alineamiento de secuencias es la etapa más crítica, por lo tanto empleamos distintos algoritmos para alinearlas, y luego realizamos modificaciones manualmente para lograr describir los datos extraídos de la bibliografía. El modelo desarrollado fue refinado y sometido a programas de validación de su estructura, donde se obtuvieron resultados muy favorables.

Debido a la escasez de datos experimentales a nivel molecular sobre la interacción con DBI decidimos, antes de continuar con el estudio, validar los principales sitios de interacción en la región extracelular del receptor GABA_A. Es por ello que realizamos simulaciones de docking molecular de ligandos cuya unión a las cavidades ortostéricas y de gran afinidad de las benzodiazepinas estaba experimentalmente caracterizada. La contrastación de los modos de unión obtenidos con la información experimental nos permitió dar contexto y valor al modelo realizado. Simultáneamente realizamos simulaciones de dinámica molecular para corroborar la estabilidad del modelo y de los complejos obtenidos con los ligandos [3].

Este análisis exhaustivo derivó en un entendimiento más profundo de la complejidad del problema planteado inicialmente: la estructura de partida por tratarse de un modelo por homología presenta incertezas inherentes a la técnica, principalmente relacionadas con la disposición de las cadenas laterales de los aminoácidos y al estado de activación en el cual se modela el receptor. Se sabe que los receptores GABA_A presentan al menos cuatro estados de activación distintos, en los cuales se modifica considerablemente su conformación. Además, la unión de cada tipo de ligando estabiliza una cierta conformación no sólo del sitio de unión sino del receptor en general. Otro de los problemas radica en que las escalas de tiempo en las cuales transcurriría la interacción con DBI o bien el paso de los iones de cloruro están en el límite de los tiempos de simulación posibles actualmente. Sin embargo, a pesar de la complejidad del sistema de interés y de las limitaciones a nivel metodológico, la exploración *in silico* de la interacción entre DBI y el receptor GABA_A es de vital interés para comenzar

a comprender las implicancias de la misma a nivel biológico, estructural y funcional.

Con el objetivo de superar la falta de datos experimentales subdividimos el estudio en tres partes: interacción con la proteína DBI completa, con el péptido de 20 residuos y con péptidos más pequeños de 8 a 12 aminoácidos. En todos los casos seguimos el mismo procedimiento que incluyó primeramente el docking de DBI y los péptidos en el receptor y luego simulaciones de dinámica molecular para analizar la estabilidad de los complejos. Pudimos proponer distintas formas de unión y obtener indicios sobre los aminoácidos más relevantes para las interacciones establecidas.

Cuatro años después de la primera estructura cristalográfica de un receptor GABA_A, en julio de 2018, se publicaron las primeras estructuras del subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, obtenidas mediante criomicroscopía electrónica a una resolución de 3,9 Å. El receptor fue resuelto unido a dos moléculas del ácido γ -aminobutírico y al antagonista flumazenil. Esto hizo posible la contrastación de la estructura del modelo y del modo de unión de los ligandos, otorgándole aún más validez al trabajo.

Por lo anteriormente relatado esta tesis cuenta con seis capítulos:

Capítulo 1: Dedicado a la descripción del problema planteado y las proteínas involucradas.

Capítulo 2: Explica el desarrollo de la metodología empleada a lo largo del trabajo haciendo énfasis en los tres pilares: modelado por homología, docking molecular y simulaciones de dinámica molecular.

Capítulo 3: Aborda el desarrollo del modelo y su evaluación estructural.

Capítulo 4: Abarca el estudio multimetodológico de la interacción del receptor con ligandos de relevancia farmacológica y científica.

Capítulo 5: Ahonda en el análisis de la interacción del receptor GABA_A con DBI y sus péptidos derivados.

Capítulo 6: Presenta las conclusiones finales y las proyecciones a futuro.

1.2. Objeto de estudio: Proteínas

Las proteínas son compuestos orgánicos complejos constituidos por una o más cadenas polipeptídicas, cada una formada por gran cantidad de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos (Figura 1.1). Los aminoácidos están formados por un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) unidos a un átomo de carbono central, junto a un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (R). El grupo lateral es el que define a cada aminoácido. Existen 20 tipos de aminoácidos en la naturaleza, cuya particular combinación da lugar a la inmensa variedad de proteínas con estructuras y funciones específicas. El esqueleto de una proteína (*backbone*), está formado por los átomos C_α , C, N y O.

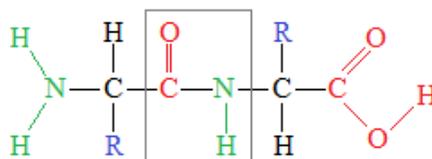


Figura 1.1: Enlace peptídico entre dos aminoácidos, el grupo ácido de uno se une al grupo amino del otro liberando una molécula de agua. Los cuatro átomos del recuadro gris forman una unidad plana rígida. No existe libertad de rotación alrededor del enlace C-N.

Las proteínas son consideradas las macromoléculas más versátiles en los sistemas vivos ya que no sólo interactúan con una inmensa variedad de moléculas sino que además realizan funciones fundamentales en prácticamente todos los procesos biológicos. Funcionan como transportadoras, almacenadoras y catalizadoras; participan en el movimiento y dan rigidez estructural a las células, cumplen roles tanto en los procesos inmunes como en la transmisión de impulso nervioso, en el control del crecimiento y en la diferenciación celular. Controlan la función génica, el flujo de materiales a través de las membranas y actúan como sensores y señalizadores [4, 5].

La descripción estructural de las proteínas se encuentra subdividida en cuatro niveles (Figura 1.2). La estructura primaria corresponde a la secuencia lineal y ordenada de aminoácidos, la estructura secundaria representa las configuraciones regulares repetidas que generan los puentes de hidrógeno entre los átomos del esqueleto polipeptídico dando lugar a, por ejemplo, hélices α , láminas β y hélices de poliprolina. La estructura terciaria es la

disposición tridimensional de la cadena polipeptídica como resultado de una intrincada red de interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos. Entre las interacciones se encuentran los puentes disulfuro entre cisteínas, atracción o repulsión electrostática entre residuos con distinta o igual carga, atracción hidrofóbica e hidrofílica, entre otras. Si la proteína está formada por más de una cadena polipeptídica (proteínas multiméricas), el arreglo de estas subunidades se denomina estructura cuaternaria.

La estructura terciaria de grandes proteínas se subdivide comúnmente en *Dominios*. Estos corresponden a regiones discretas que se diferencian estructuralmente, espacialmente o funcionalmente de otras partes de la proteína.

Las técnicas experimentales más empleadas para la resolución de su estructura tridimensional son la Cristalografía de Rayos X, la Resonancia Magnética Nuclear y la Criomicroscopía electrónica. Las estructuras están definidas a partir de la posición de cada uno de los átomos que las componen. Esta información se halla en la base de datos de proteínas o PDB (del inglés *Protein Data Bank*) [6, 7].

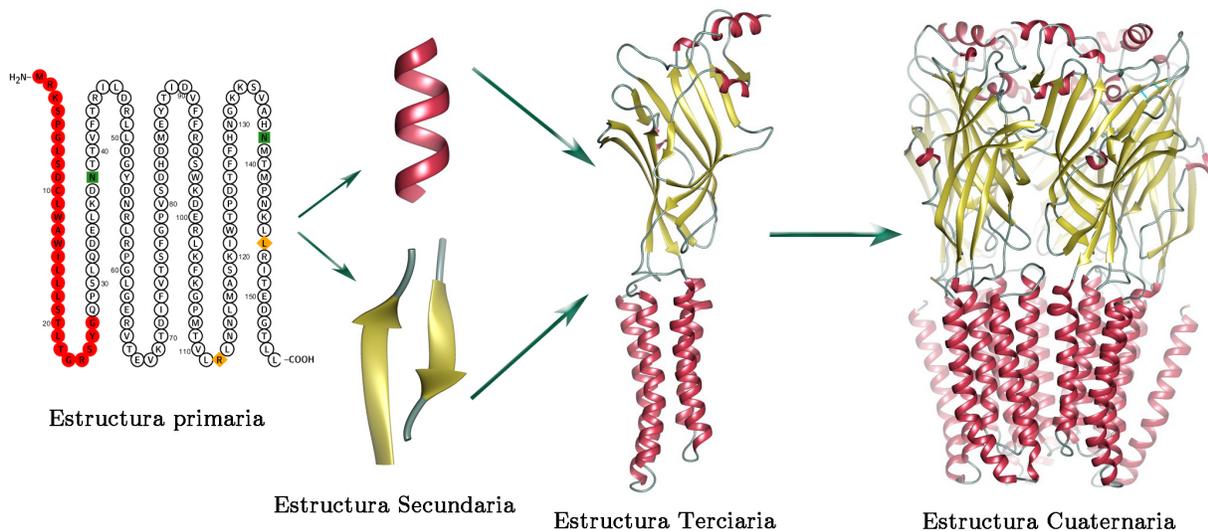


Figura 1.2: Diagrama de los cuatro niveles estructurales de las proteínas.

Existe una estrecha relación entre la secuencia de aminoácidos, la estructura nativa de la proteína y la función que desempeña en los organismos [4, 5, 8]. Tanto Max Perutz en la década del 60, como Christian Anfinsen en la década del 70, presentaron evidencias de que la secuencia de aminoácidos de una proteína determina su estructura tridimensional [9, 10]. Del

mismo modo, la función de las proteínas está fuertemente correlacionada con su arquitectura global, la dinámica interna del plegamiento y sus propiedades superficiales [11].

Se denominan proteínas homólogas a aquellas proteínas, pertenecientes a la misma especie o no, que provienen de un ancestro común y poseen secuencias similares. En estos casos la probabilidad de llevar a cabo funciones semejantes es alta. Se ha observado que a lo largo de la historia evolutiva la estructura se conserva más que la secuencia [12].

1.2.1. Proteínas de membrana

Las membranas celulares son esenciales para la vida celular ya que definen los límites tanto de las células como de sus organelas y median el intercambio de sustancias entre el exterior y el interior. Están formadas principalmente por distintas clases de fosfolípidos y colesterol, ordenados en una bicapa de entre 7 y 9 nm de grosor. Los fosfolípidos se disponen de manera tal que las cabezas hidrofílicas están expuestas al solvente y las colas hidrofóbicas apuntan hacia el interior de la membrana. Así mismo, se unen a la membrana distintas proteínas y azúcares. Si las proteínas atraviesan toda la membrana y quedan expuestas a ambos lados, se denominan intrínsecas, transmembrana o integrales; si sólo están expuestas de un lado entonces son denominadas extrínsecas o ancladas (Figura 1.3). Las proteínas transmembrana están fuertemente unidas a la bicapa lipídica, mientras que las extrínsecas no.

Entre un 20 y un 30 % de los genes de la mayor parte de los organismos codifican proteínas de membrana [14, 15]; es decir que en el genoma humano hay aproximadamente 7.000 proteínas de membrana codificadas [16]. Ellas cumplen un rol fundamental en el funcionamiento celular como mediadoras entre el medio externo y el interno. Las proteínas de membrana interactúan con distintos tipos de partículas que van desde fotones, iones y moléculas pequeñas, hasta macromoléculas como otras proteínas o ácidos nucleicos.

Hay distintos tipos de proteínas integrales de membrana que se clasifican según su función en: transportadores, receptores, enzimas y otros. Los primeros permiten el pasaje de moléculas hidrofílicas a través de la bicapa lipídica. Así los canales iónicos, por ejemplo, regulan la concentración de iones, generando y manteniendo gradientes electroquímicos.

A pesar del gran número de genes que codifican proteínas de membrana, estas constituyen

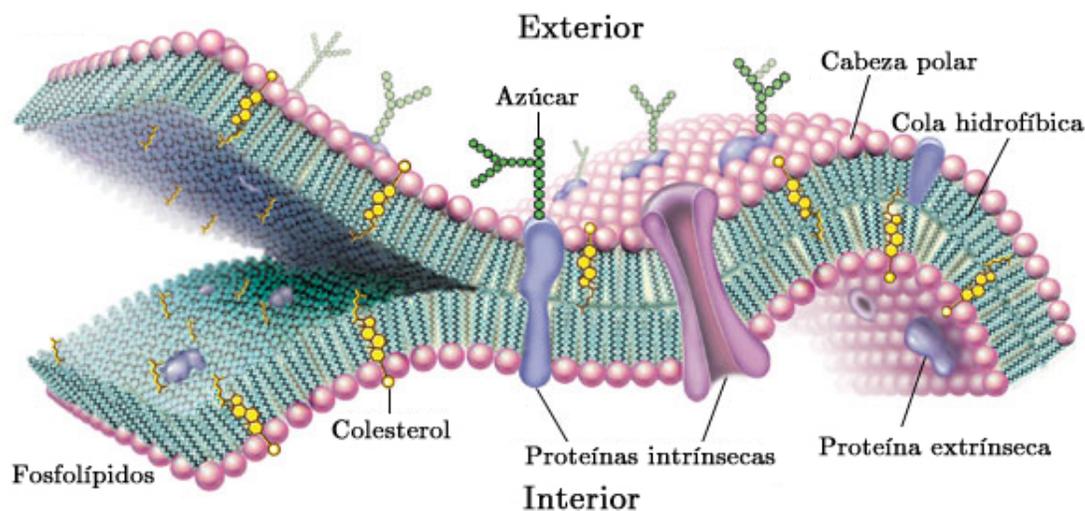


Figura 1.3: Representación esquemática tradicional de la membrana celular. Figura adaptada de la Enciclopedia Británica [13].

una pequeña fracción ($\sim 3,2\%$) de todas las estructuras depositadas en la base de datos de proteínas (PDB) [6]. Determinar la estructura de este tipo de proteínas es dificultoso debido a que no es sencillo expresar cantidades suficientes de las proteínas y a que no es fácil encontrar una membrana que preserve la estructura nativa de estas macromoléculas [17]. Además si las proteínas presentan fragmentos móviles, es necesario remplazarlos o eliminarlos para que puedan formar cristales [2].

1.2.2. Interacción proteína-ligando

El reconocimiento molecular es el proceso en el cual macromoléculas biológicas interactúan entre si o con otras moléculas pequeñas para formar complejos específicos. Este es el pilar de todos los procesos en los organismos vivos [18]. El reconocimiento molecular está definido por la especificidad y la afinidad de los compuestos interactuantes.

Las interacciones proteína-proteína regulan una miríada de funciones celulares, que incluyen la transducción de señales, el metabolismo de compuestos y la realización del ciclo celular. Esto se traduce a nivel sistémico en la regulación de la homeostasis y en un desarrollo fisiológico normal. Debido a su amplia incidencia, estas interacciones son potenciales blancos terapéuticos. Aproximadamente el 40% de las interacciones proteína-proteína involucran péptidos que llevan a cabo funciones cruciales en distintos caminos de señalización y

regulación de las células.

Por su parte, los ligandos, ya sean naturales o artificiales, se clasifican en función de su efecto sobre el receptor. Se denominan agonistas a aquellas moléculas que activan a un receptor al unirse a él, mientras que los agonistas parciales producen una respuesta intermedia. Por su parte, los agonistas inversos actúan en forma opuesta al agonista. Los antagonistas son aquellas sustancias que al unirse no generan ningún cambio o acción pero impiden la unión de otros ligandos a ese sitio, es decir poseen afinidad por sus receptores pero no son eficaces. La acción de distintos ligandos sobre las proteínas varía no sólo con su composición química sino también con su concentración, con el tipo de receptor o posibles mutaciones en las proteínas blanco.

El efecto de modulación alostérica positiva o PAM (por sus siglas en inglés *Positive Allosteric Modulation*) es el aumento de la acción de los agonistas. Por ejemplo, en los receptores GABA_A estos aumentan la duración de las corrientes inhibitorias postsinápticas. Por el contrario, los moduladores alostéricos negativos o NAM (por sus siglas en inglés *Negative Allosteric Modulation*) son aquellas moléculas que disminuyen la acción del agonista. En ambos casos el efecto puede producirse sobre la capacidad del agonista de unirse a la proteína, o bien puede incidir sobre la activación del receptor luego de la unión del agonista.

1.3. Receptores pLGICs y Cys-Loop

Los receptores de la familia de canales iónicos pentaméricos activados por ligando o pLGICs (del inglés *pentameric Ligand Gated Ion Channels*) son proteínas integrales de membrana formadas por cinco subunidades homólogas que rodean un poro central que permite regular selectivamente el flujo de iones a través de la membrana plasmática. De esta forma, median la transmisión sináptica rápida en el sistema nervioso. Cada subunidad contiene un dominio amino-terminal extracelular (ECD), seguido de cuatro segmentos transmembrana (TMD) y un dominio intracelular variable (ICD) formado por un loop entre las hélices alfa transmembrana M3 y M4 [19] (Figura 1.4).

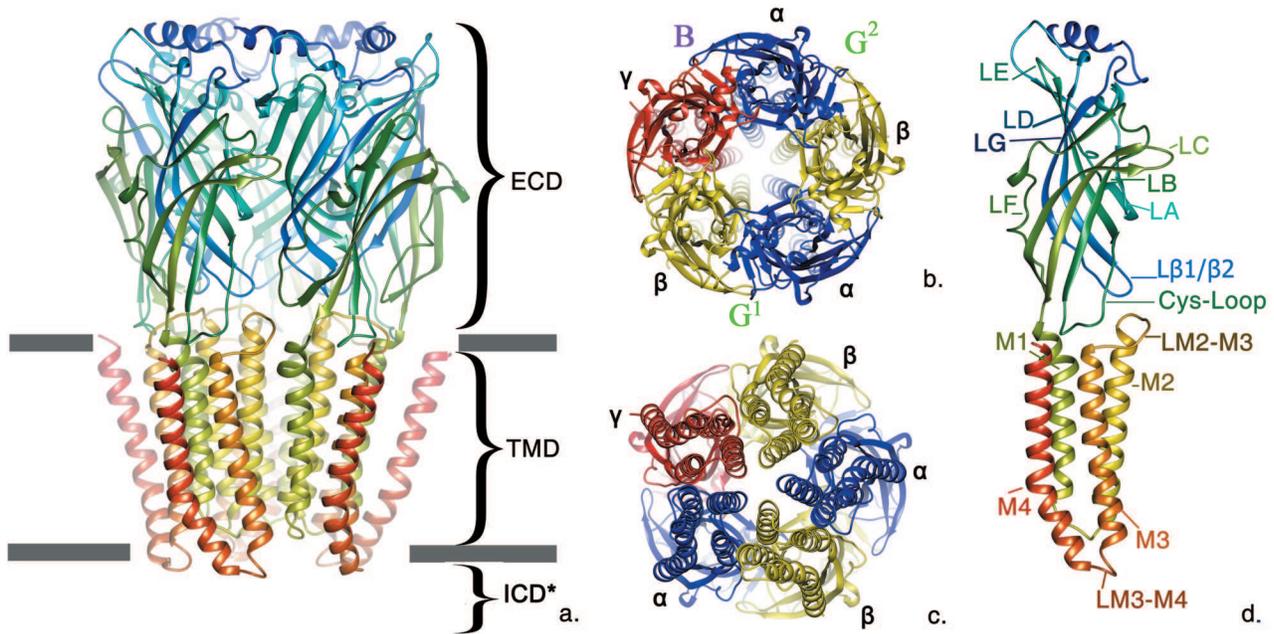


Figura 1.4: Diferentes vistas de un receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ no-nativo. a. En la vista lateral del receptor están indicados el dominio extracelular (ECD), el transmembrana (TMD) y la región en la que se encontraría el dominio intracelular (ICD*) común a todos los receptores de la familia Cys-Loop; b. Vista desde el exterior de la célula de un receptor del tipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, las subunidades α_1 se muestran en azul, las β_2 en amarillo y γ_2 está coloreada de rojo. El sitio de unión de las benzodiazepinas está indicado con la letra B, y los sitios ortostéricos con la letra G; c. El mismo receptor visto desde el interior de la célula; d. Vista lateral de la subunidad α_1 . Las estructuras relevantes están representadas por una L en el caso de los *loops* y M las helices transmembrana. Existe evidencia de que el *loop* β_1/β_2 y el M2-M3 están directamente involucrados en el funcionamiento del receptor y el pasaje entre estados [20, 21].

La unión de un neurotransmisor a, por lo menos, un sitio ortostérico inicia una serie de cambios conformacionales graduales que derivan a la activación del canal, es decir, un estado conductor. Así mismo, la modificación de la fluidez de la membrana o la unión de otros compuestos, tanto endógenos como exógenos, en sitios alostéricos pueden modular la apertura de dichos canales [22].

Los pLGICs están correlacionados evolutivamente [23] y se distribuyen en forma ubicua en la mayor parte de los grupos taxonómicos excepto en plantas multicelulares y hongos. Tienen una historia evolutiva compleja que involucra una alta tasa de pérdida de genes y transferencia horizontal múltiple [24].

En particular, los receptores Cys-Loop son un subconjunto presente en los organismos eucariotas, que se caracterizan por poseer un loop formado por un puente disulfuro entre dos cisteínas [24]. Existen dos grupos monofiléticos principales: los canales aniónicos inhibitorios

que contienen a los receptores GABA_A [25, 26], receptores de glicina (GlyR) [27] y de glutamato (GluCl) [28]; y los canales catiónicos o excitatorios como los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) [29], los receptores de serotonina (5-HT₃R) [30] y los canales activados por Zinc (ZAC) [31]. La selectividad por uno u otro tipo de ión está regulada por la distribución de carga en el segmento conector entre las hélices M1 y M2 del dominio transmembrana y por el ICD [32].

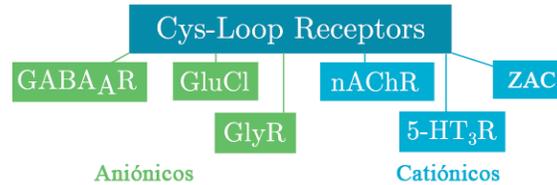


Figura 1.5: Esquema de los receptores Cys-Loop

Los pLGICs son entidades altamente dinámicas [33], lo cual dificulta la caracterización completa de estados conformacionales puros. Se han propuesto al menos cuatro estados conformacionales principales para estos receptores [34–36]. Cada uno de ellos representa un estado de apertura/cerrado del canal y una afinidad distinta por los ligandos.

El poro del canal en el dominio transmembrana presenta tres constricciones principales en los residuos -2', 9' y 20' (Figura 1.6.a), correspondientes a los distintos estados de activación del receptor [34]. Un anillo de Leucinas en la posición 9' es particularmente relevante ya que forma un cierre hidrofóbico que regula el flujo de iones en el estado basal.

En el estado activo, el canal se encuentra abierto permitiendo el flujo de iones a través del poro y presenta gran afinidad por los agonistas. Se caracteriza por la inclinación de las hélices M2 en forma cónica con los residuos superiores formando anillos más amplios (Figura 1.6.c) que alcanzan radios de 3,5 Å para el anillo 9', y 6,0 Å para el anillo 20'. En los receptores GABA_A el anillo inferior posee radios ligeramente mayores debido a la presencia de Alaninas en las subunidades β [34].

Cuando se produce una exposición prolongada al agonista, los receptores acceden a un estado desensibilizado en el cual el canal se cierra en la porción intracelular del dominio transmembrana (Figura 1.6.b) reteniendo una gran afinidad por los agonistas [21, 37]. La constricción más angosta se ubica en el anillo inferior, mientras que los anillos superior y

medio poseen diámetros comparables al receptor abierto .

En el estado basal inactivo los canales no conducen iones y poseen el poro cerrado a la altura del anillo hidrofóbico 9' (Figura 1.6.a) [38]. El estado pre-activo o *flipped* es considerado una fase intermedia entre el estado basal y el abierto, en el cual el poro aún se mantiene cerrado pero presenta una afinidad superior por los agonistas [39]. Se ha descrito también un estado cerrado estabilizado por antagonistas, que difiere del estado basal en la disposición de las hélices M2, ortogonales a la membrana plasmática (Figura 1.6.d) [40] .

Los receptores permanecen en un equilibrio dinámico entre los estados cerrados y abiertos [20]. Los cambios conformacionales inducidos a partir de la unión de los ligandos comienzan en los sitios de unión y son transmitidos gradualmente al dominio transmembrana desencadenando la apertura del poro. Existe evidencia de que el loop β_1/β_2 y el M2/M3 están directamente involucrados en la función del receptor y en la transición entre diferentes estados [20, 21].

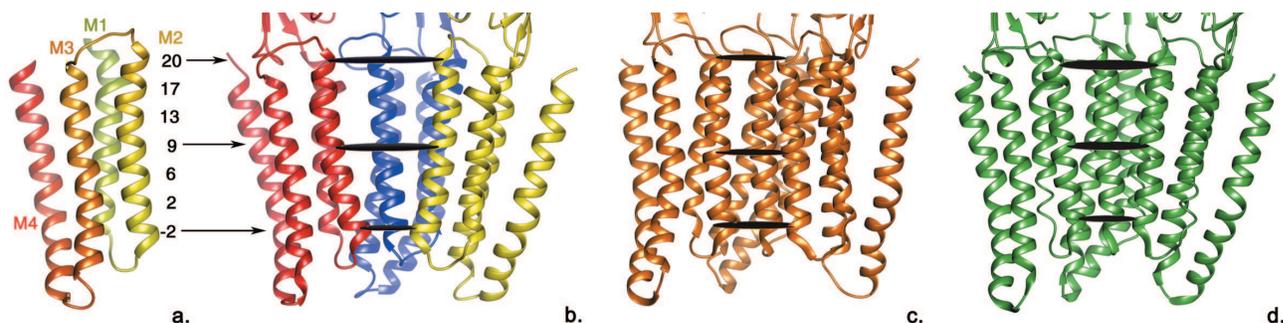


Figura 1.6: El Dominio Transmembrana. a. Los residuos de la hélice M2, la cual forma el poro del canal, se numeran según el código indicado; b. Receptor en estado cerrado desensibilizado correspondiente al modelo por homología que se realizó en este trabajo; c. Estado cerrado estabilizado por antagonistas representado por el homopentámero de subunidades α_3 de GlyR (PDB ID:5CBF) [40]; d. El estado abierto está representado por la estructura del receptor GluCl (PDB ID: 3RHW).

1.3.1. Breve historia de la determinación estructural de los pLGICs

En los últimos años la información experimental acerca de la estructura de este tipo de receptores ha aumentado en forma exponencial. No obstante, la expresión y determinación de las estructuras tridimensionales de los receptores GABA_A, y de los pLGICs en general, continúa siendo dificultosa. Es importante destacar que de acuerdo al PDB, sólo 20 estructuras únicas de esta familia de receptores han sido reportadas. Como consecuencia, el estudio

detallado de estos receptores ha sido obstaculizado, lo que a su vez ha retrasado el desarrollo de fármacos y tecnologías relacionadas a ellos.

En 1999, Miyazawa y colaboradores [41] reportaron la primera estructura de un receptor nACh de *Torpedo marmorata* resuelta mediante criomicroscopía electrónica a 4,6 Å. A pesar de su baja resolución se pudieron obtener características generales de los tres dominios y la estructura secundaria, así como la ubicación del poro. En 2005 Unwin y colaboradores publicaron una estructura refinada de este receptor con una resolución de 4 Å [42].

Por otro lado, las primeras estructuras cristalográficas obtenidas, relacionadas a los pLGICs, fueron de la proteína AChBP (del inglés *Acetylcholine Binding Protein*), que es un homólogo del ECD de los receptores nACh. AChBP es una proteína soluble de 210 residuos que modula la transmisión sináptica en moluscos con una farmacología similar a las subunidades α de los nAChRs [43]. Las primeras estructuras se obtuvieron en el año 2001 y sirvieron durante mucho tiempo como modelo para estudiar los pLGICs [44]. Al momento se han cristalizado cerca de 50 estructuras en distintos estados de activación y unidas a una gran variedad de ligandos. La identificación de homólogos con estructuras más simples y que pueden expresarse más fácilmente constituye una alternativa común a la resolución de proteínas más complejas [45].

El siguiente gran avance aconteció en 2008 cuando se publicaron las primeras estructuras de canales iónicos activados por ligando de los organismos procatiotas *Erwinia chrysanthemi* (ELIC) [46] y, en 2009, de *Gloeobacter violaceus* (GLIC) [47]. Estos receptores habían sido identificados como homólogos de los pLGICs a través de búsquedas de perfiles de secuencias [48] y se comprobó que poseen estructuras terciarias y cuaternarias similares, y que comparten motivos conservados con los receptores Cys-loop.

En el año 2011 se publicó la estructura del primer receptor aniónico Cys-loop perteneciente al invertebrado *C. elegans* [34], así como también otras estructuras de los receptores procarióticos GLIC [49] y ELIC [50]. La resolución de estas estructuras en distintos estados y con una variedad de ligandos unidos fue fundamental para el desarrollo de modelos para estudiar a otros miembros de esta familia de receptores.

El 2014 fue un año prolífico en el cual se publicaron las primeras estructuras obtenidas mediante difracción de rayos X de los receptores de serotonina 5-HT₃ de ratón (PDB ID:

4PIR, resolución: 3,50 Å) [32] y GABA_A de humano (PDB ID: 4COF, resolución: 2,97 Å) [2]. El receptor de Serotonina fue resuelto incluyendo dos hélices del ICD. Por otro lado, de la estructura del homopentámero de subunidades β_3 del receptor GABA_A se resolvieron sólo los dominios extracelular y transmembrana. La estructura permitió identificar mutaciones asociadas a enfermedades como epilepsia, convulsiones febriles e insomnio. Esta fue la primera estructura de un pLGIC en mostrar un estado desensibilizado. Es pertinente aclarar que este subtipo no se ha identificado aún en el sistema nervioso central (SNC) humano, pero su ensamblaje en receptores funcionales es energéticamente favorable.

En 2015 se publicó la primera estructura cristalográfica del homopentámero α_3 GlyR [40]. La publicación de nuevas estructuras pertenecientes a eucariotas implicó un gran avance en el modelado de los receptores GABA_A. La primera estructura de un receptor heteromérico, el $\alpha_4\beta_2$ nAChR, el subtipo más abundante en el cerebro de humano, se resolvió en el año 2016 [51]. Entre 2017 y 2018 se publicaron dos estructuras quiméricas de GABA_ARs empleadas en el estudio de unión de neuroesteroides [52, 53].

La determinación estructural de los receptores GABA_A es afectada por limitantes inherentes a ellos, como su gran tamaño (~50 kD), baja abundancia y heterogeneidad [54]. Debido a la falta de una estructura cristalográfica de alta resolución de receptores GABA_A heteropentaméricos, en los últimos años ha habido un gran desarrollo de modelos por homología para obtener información sobre su estructura y función. A su vez, este desarrollo favoreció el estudio de los efectos de una miríada de ligandos farmacológicamente relevantes.

Existen diversos modelos publicados a lo largo de los años empleando en sus comienzos a las proteínas AChBP como estructuras de referencia (aunque su identidad de secuencia es de entre 15 y 30%). En la medida que aumentó el número de estructuras de receptores de la familia de los pLGICs en el PDB (Figura 1.7), modelos basados en ella mostraron mejoras sustanciales [1, 55, 56]. El modelo que se presenta en este trabajo se destaca por estar en un estado cerrado desensibilizado, generado a partir de la única estructura de un receptor GABA_A en el PDB (hasta julio de 2018).

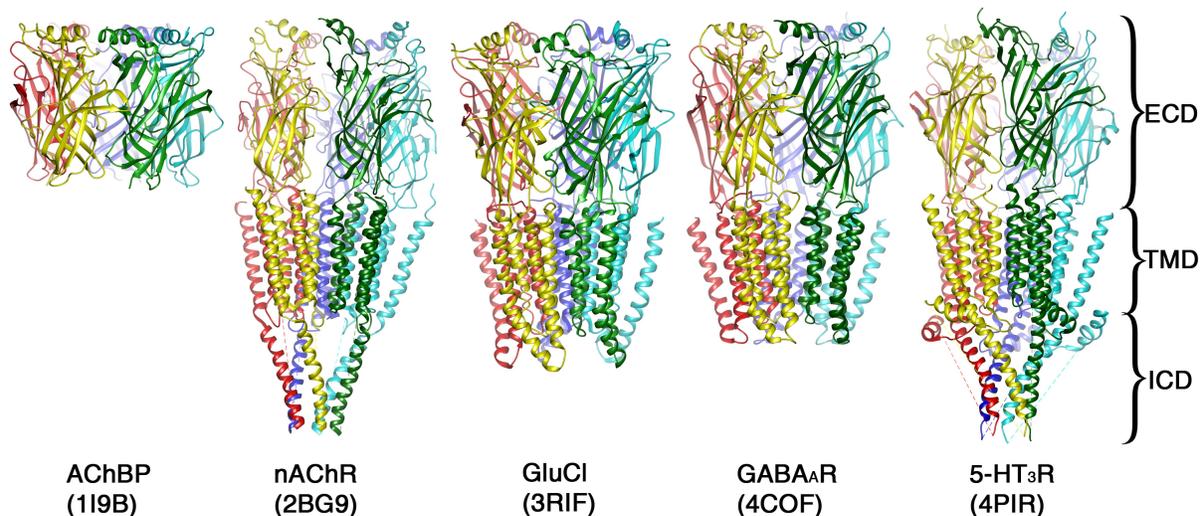


Figura 1.7: Estructuras de receptores homólogos empleadas para modelar al receptor GABA_A.

Finalmente, a mediados de 2018, se publicaron las primeras estructuras de receptores GABA_A heteroméricos $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (PDB ID: 6D6U y 6D6T) [57]. Las mismas fueron resueltas a partir de la técnica criomicroscopía electrónica con resoluciones de $\sim 3,9$ Å. Si bien actualmente pueden realizarse estudios con la estructura experimental, cabe destacar que para interpretar los mapas de densidad electrónica del receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ los autores acudieron al modelado por homología empleando la estructura del homopentámero como plantilla [57].

1.4. Receptor GABA_A

Los receptores del ácido γ -aminobutírico tipo A, son una clase de canales iónicos activados por ligando que median la inhibición rápida del SNC de los mamíferos. Existe una gran variedad de subtipos de receptores GABA_A que presentan patrones de expresión regionales, celulares y subcelulares particulares, así como también funciones específicas. Esta diversidad se debe a la formación de receptores a partir de distintas combinaciones de las 19 subunidades conocidas: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π , ρ_{1-3} ¹ [58, 59]. El subtipo más abundante en el SNC de los seres humanos es el $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (constituye un 60% del total) [60, 61]. El orden de las

¹Los receptores homoméricos formados por subunidades ρ se denominan comúnmente receptores GABA_C.

subunidades observado desde el extremo extracelular es en sentido horario $\alpha_1\text{-}\beta_2\text{-}\alpha_1\text{-}\beta_2\text{-}\gamma_2$ (Figura 1.4.b) [62, 63].

1.4.1. Dominios

Al igual que el resto de los Cys-Loop, los receptores GABA_A se encuentran divididos en tres dominios [64]: el extracelular, el transmembrana y el intracelular. El ECD también se conoce como el dominio de unión de ligandos ya que alberga los sitios de unión ortostéricos, de gran afinidad de las benzodiazepinas y de iones, entre otros. Está formado por diez láminas beta y dos hélices alfa. El TMD está formado por cuatro hélices alfa y controla la apertura y cerrado del canal a través de movimientos de las hélices interiores (M2) que delimitan el poro central. Además contiene los sitios de unión para otros ligandos como neuroesteroides, etanol, anestésicos y colesterol. El ICD o loop intracelular no ha sido completamente resuelto experimentalmente, sin embargo, por homología con otros miembros de la familia se sabe que está parcialmente formado por hélices alfa. Este dominio ayuda a modular el flujo de iones y la función del canal mediante diferentes mecanismos como fosforilación de Tirosinas [65, 66] y la interacción con otras proteínas [61].

1.4.2. Funcionamiento

Los receptores GABA_A son mediadores de la neurotransmisión inhibitoria rápida. Al unirse el agonista a su sitio de unión ocurren cambios conformacionales que derivan en la apertura del poro y aumenta el pasaje de iones cloruro a través de la membrana celular. El ingreso de los iones provoca la hiperpolarización de la neurona, inhibiendo el impulso nervioso. La transición entre los estados cerrado y abierto es rápida (del orden del submicrosegundo), y el canal se mantiene abierto en el rango del microsegundo al milisegundo [33].

Existen receptores sinápticos (principalmente formados por subunidades α_1 , α_2 y α_3 sumado a subunidades β_2 y β_3 , y γ_2) que convierten las variaciones sinápticas de GABA en corrientes fásicas de Cl⁻ a alta frecuencia. Esta forma de transferencia de la información es eficiente ya que abarca tiempos del orden del milisegundo. A esta categoría pertenece

el receptor que se estudiará en este trabajo. También existen receptores extrasinápticos o perisinápticos (formados principalmente por α_4 , α_5 y α_6 sumado a subunidades β , γ o δ) que responden a concentraciones de GABA menores y permanentes a lo largo del tiempo. Este tipo de receptores son menos proclives a desensibilizarse y por lo tanto median la inhibición tónica a largo plazo.

Los receptores GABA_A están involucrados en diversas funciones del SNC y por lo tanto su buen funcionamiento está directamente relacionado con la salud de los individuos. Cada una de las subunidades presenta acciones específicas. La subunidad α_1 está asociada a la acción sedativa, anestésica, anticonvulsiva, con la amnesia y el control de la respiración [67–69]. La subunidad α_2 se asocia a los efectos ansiolíticos (y ansiogénicos) [70–72], la relajación muscular y es responsable de la potenciación de la acción del diazepam por etanol [73]. La subunidad α_3 está también relacionada con la ansiólisis y la relajación muscular [72, 74]. La subunidad α_5 tiene influencia en la relajación muscular y está relacionada con el desarrollo cognitivo y de la memoria para la ubicación de objetos. Se ha probado que una disminución en la actividad de receptores que contienen esta subunidad mejora las capacidades cognitivas de personas con síndrome de Down [75, 76]. β_3 es fundamental para la anestesia con etomidato y propofol (no así con otros anestésicos volátiles); además es el sustrato del ácido valerénico (ansiolítico) [77].

Un mal funcionamiento de estos receptores puede llevar a desordenes [78] como depresión [79, 80], ansiedad [79, 81], abuso de sustancias [82], distintos tipos de epilepsia [83–85], dependencia al alcohol [73, 82], desordenes del sueño [61], esquizofrenia [86], dificultades cognitivas, pérdida de la memoria, autismo [87, 88] y deficiencias en el procesamiento de información sensoriomotora [61].

Debido a la relevancia que tienen los receptores GABA_A para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central de los mamíferos y su relación con una gran cantidad de desórdenes neuro-psiquiátricos, entender su funcionamiento resulta imperioso.

1.4.3. Sitio de unión ortostérico

Por definición, los sitios ortostéricos o activos, son aquellas regiones del receptor en las cuales se unen los ligandos primarios. El receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ posee dos sitios ortostéricos

localizados en el dominio extracelular entre la cara principal de una subunidad β y la cara complementaria de una subunidad α ($\beta + / \alpha -$). El sitio G^1 está rodeado por las subunidades γ y β , y el sitio G^2 está entre una α y γ (Figuras 1.4.b y 1.8).

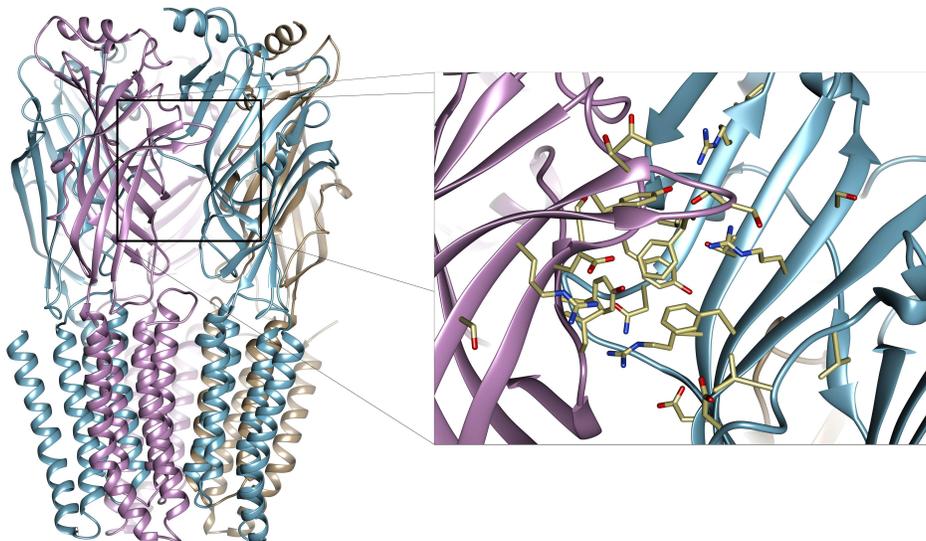


Figura 1.8: Sitio de unión ortostérico G^2 . La cavidad ortostérica se encuentra parcialmente cubierta por el loop C de la subunidad principal, el cual se mueve de acuerdo a la presencia o ausencia de los ligandos. En lila se representa la subunidad β y en celeste la subunidad α

Diferentes ligandos se unen a estas cavidades, entre ellos el agonista ácido γ -aminobutírico (GABA), muscimol, la bicuculina y gabazine (S-95531). GABA (Fig.1.9.a) es un neurotransmisor, mediador de la inhibición pre-sináptica [89] mediante la activación de receptores ionotrópicos ($GABA_A$ y $GABA_C$) y metabotrópicos ($GABA_B$). Este γ -aminoácido, que se sintetiza en el sistema nervioso central a partir del aminoácido glutamato [90], es un zwitterión electroneutral (con punto isoelectrónico 7.3) a pH fisiológico. Muscimol (5-aminomethyl-3-isoxazolol) (Fig.1.9.b) es un agonista de los $GABA_A$ Rs y potente neurotóxico. El grupo amino-metil de muscimol puede rotar libremente respecto al anillo plano isoxazol, aumentando así sus grados de libertad [91,92]. Por otro lado, la bicuculina y gabazine son antagonistas competitivos de los $GABA_A$ Rs (Fig.1.9.c y d).

En los últimos años muchos artículos científicos han señalado residuos hipotéticamente importantes para la unión de los ligandos y para la función del receptor (Ver Tablas A1 y A2 del Apéndice). Se han identificado tres Argininas (β_2 Arg207, α_1 Arg132 y α_1 Arg67) como estabilizadoras del grupo carboxilato de GABA, ya que su mutación independiente

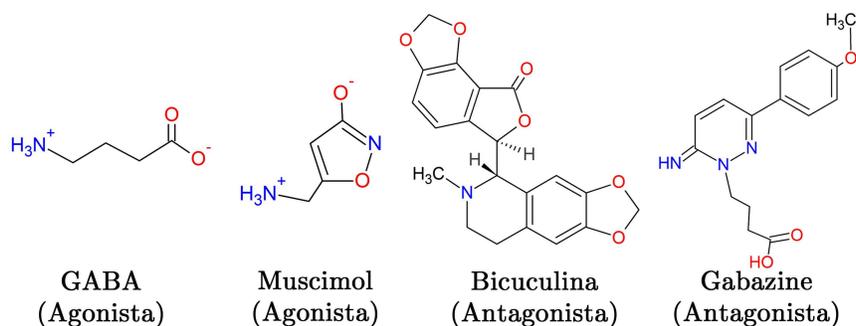


Figura 1.9: Estructuras químicas de los ligandos del sitio de unión ortostérico elegidos para estudiar en este trabajo.

genera un decrecimiento en la unión de dicho ligando pero no evita por completo su unión [93, 94]. Además, cuatro residuos fueron identificados como parte de una red iónica que influye directamente sobre la estabilidad de las conformaciones abiertas y cerradas, así como también sobre la regulación de los movimientos del loop C: β_2 Glu153, β_2 Glu155, β_2 Lys196 y β_2 Arg207 [56, 95].

1.4.4. Sitio de unión de las Benzodiazepinas

El primer sitio de unión de las benzodiazepinas fue identificado a fines de los años 70 y a principios de los años 80 [96–98]. Fue localizado mediante el método *photoaffinity labeling* y se describió como una proteína de membrana de 50 kDa que luego sería reconocida como la subunidad α de los receptores GABA_A. Estudios posteriores demostraron que para obtener receptores GABA_A recombinantes sensibles a las benzodiazepinas, al menos una subunidad α y una subunidad β deben co-expresarse con la subunidad γ_2 [99, 100].

Este sitio de unión está ubicado en la región extracelular, entre la cara principal de la subunidad α y la cara complementaria de la subunidad γ ($\alpha + / \gamma -$) (Fig.1.10). Más específicamente, está formado por los loops A, B y C de $\alpha_{1,2,3,5}$ y los loops D, E y F de γ_2 .

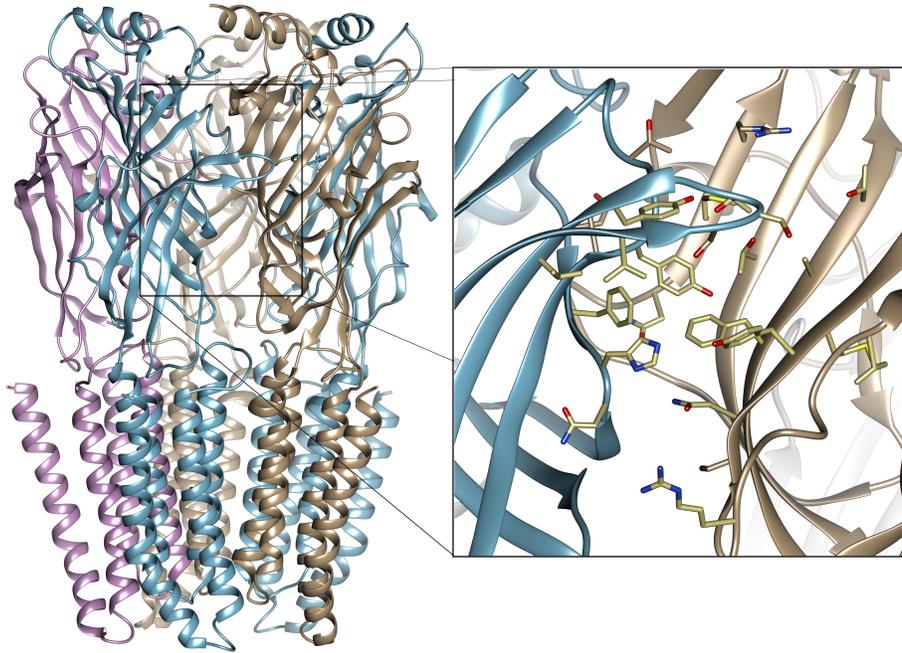


Figura 1.10: Sitio de unión de gran afinidad de las Benzodiazepinas. Se representa en celeste la subunidad α y en beige la subunidad γ

Se ha propuesto la existencia de al menos tres sitios de unión para las benzodiazepinas [101]: i. Un sitio de gran afinidad entre las subunidades ($\alpha + / \gamma -$), anteriormente descrito; ii. Un sitio de baja afinidad en una posición homóloga entre las subunidades ($\alpha + / \beta -$) [102]; iii. Un sitio de baja afinidad en el TMD [103], homólogo al sitio de unión de la ivermectina en GluCl [34].

El efecto producido por cada benzodiazepina depende fuertemente del tipo de subunidad α presente. Por ejemplo, las subunidades α_4 y α_6 no son sensibles a las benzodiazepinas clásicas debido, principalmente, a una mutación natural entre la Histidina del loop A y una Arginina. Esta misma mutación provoca cambios en los efectos que tienen otras benzodiazepinas [104].

Existe una variedad de compuestos que se unen a este sitio y cada uno ejerce efectos distintos. Las estructuras empleadas en este trabajo para caracterizar este sitio de unión se muestran en la Figura 1.11. Las benzodiazepinas clásicas (BZDs) como diazepam, flurazepam, clonazepam y flunitrazepam exhiben un núcleo común 1,4-benzodiazepínico con un sustituyente 5-fenil [105] y todas ellas son moduladores alostéricos positivos (PAM).

Por su parte, las imidazo-benzodiazepinas (i-BZDs), como el antagonista flumazenil (Ro15-1788) y el modulador alostérico negativo (NAM) Ro15-4513, poseen en lugar del sustituyente 5-fenil un anillo imidazol entre las posiciones 1 y 2 del núcleo diazepínico. El flumazenil posee afinidad inusualmente alta por este sitio, por lo que es frecuentemente utilizado como control en el estudio de otros compuestos.

Además, hay otros ligandos que no pertenecen a esta familia de compuestos que actúan en el sitio de unión, estos incluyen a la imidazopiridina zolpidem y la ciclopirrolona eszopiclona, ambos moduladores alostéricos positivos. La eszopiclona se ha establecido firmemente como un efectivo y tolerado agente sedante para el tratamiento del insomnio [106].

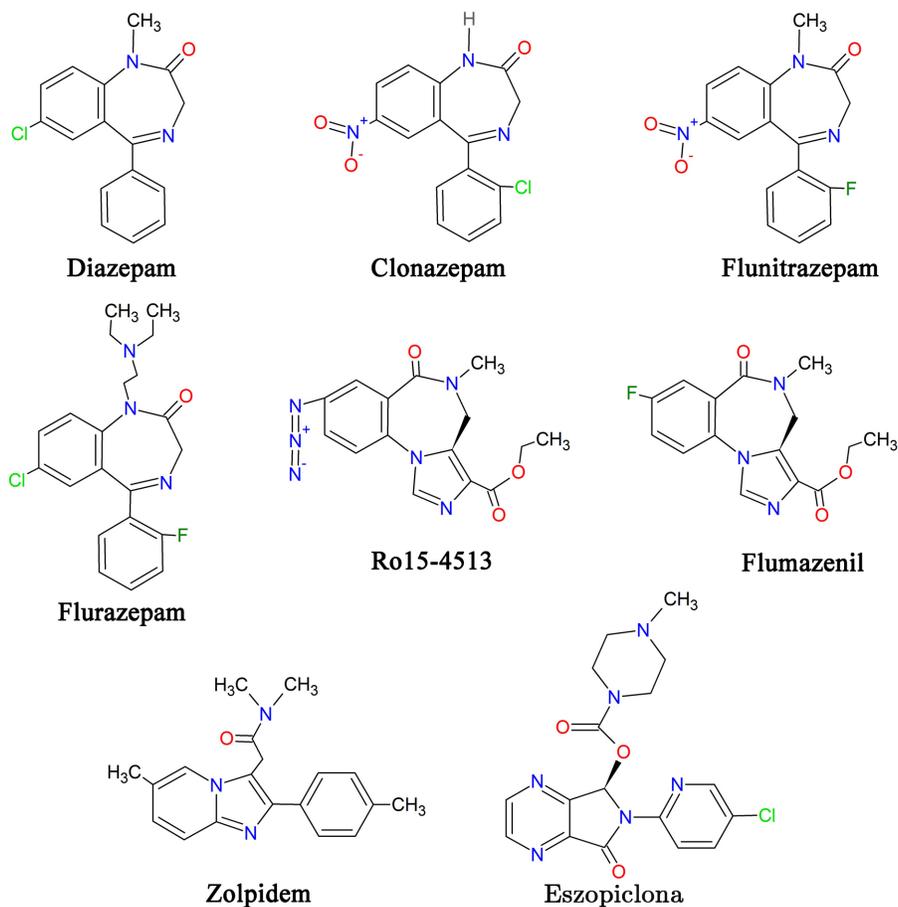


Figura 1.11: Estructuras químicas de los ligandos del sitio de unión de las benzodiazepinas elegidos para realizar este trabajo.

Existen distintas teorías respecto a como los moduladores alostéricos de esta cavidad afectan la conductividad generada por GABA. Según ciertos trabajos [107, 108] los PAM

aumentan la actividad de GABA al disminuir la concentración de GABA necesaria para ejercer la actividad del canal al 50% de su máximo (EC_{50}). Mediante estudios de unión de radioligandos y análisis electrofisiológicos se ha demostrado una interacción funcional entre los sitios de unión ortostéricos y de unión de las benzodiazepinas [109,110]. Sin embargo, la evidencia estructural sobre la comunicación entre los sitios aún es escasa.

1.5. ACBP - DBI y su interacción con el receptor GABA_A

Los receptores GABA_A son el blanco de una gran variedad de ligandos así como también de péptidos y proteínas que intervienen en su modulación. Dentro de dichas interacciones se destaca la unión de la proteína ACBP (*acyl-CoA binding protein*) también llamada DBI (del inglés *Diazepam Binding Inhibitor*) [111,112].

DBI es una proteína de aproximadamente 86 aminoácidos (10 kDa) con capacidad transportadora de ésteres de ácidos grasos [113]. Está formada por cuatro hélices α dispuestas en forma de cuenco (Figura 1.12) [114]. Se la ha asociado con distintas funciones en el organismo dependiendo del lugar en el cual se encuentre expresada: es capaz de regular la ingesta de alimentos, la señalización celular, la expresión genética y la biogénesis de membranas [111]. También controla el metabolismo de lípidos a través de su interacción con ésteres acyl-CoA de cadena larga a los cuales remueve de la membrana, transporta, almacena y dona [115]. La estructura primaria de DBI se ha preservado a lo largo de la evolución, sugiriendo que participa en funciones biológicas importantes [116–120].

La digestión, o proteólisis, de DBI genera distintos péptidos: el Triacontatetraneuropeptido (TTN) que en el ser humano posee 36 residuos (DBI 18-53), el Octadecaneuropeptido (ODN) de 20 aminoácidos (DBI 34-53) y el Octapeptido (OP) de 10 aminoácidos en el ser humano (DBI 44-53). Ellos también actúan alostéricamente sobre el receptor GABA_A y el receptor periférico de benzodiazepinas [121] desplazando a las BZDs. La forma mediante la cual esta proteína y sus péptidos interactúan con el receptor GABA_A es aún desconocida. Todos ellos se expresan endógenamente en el cerebro, tanto en astrocitos como en neuronas [122,123].

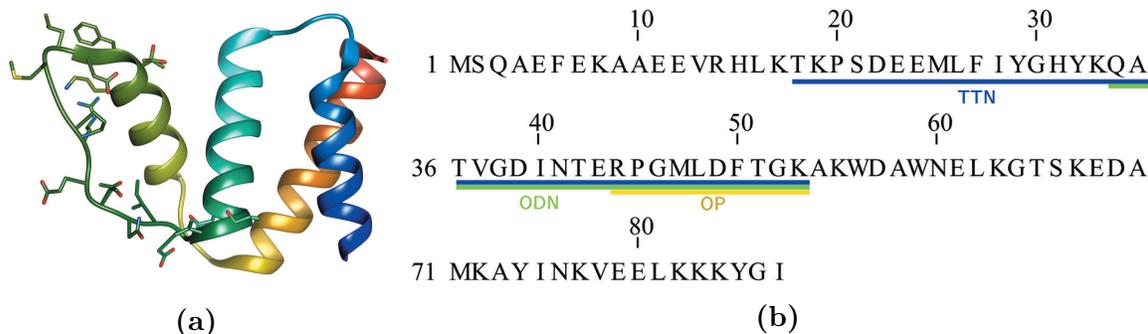


Figura 1.12: ACBP/DBI de humano. a. Los residuos correspondientes al péptido ODN están representados explícitamente [114]. Se ha propuesto que este loop (que une las hélices 2 y 3) es el que interactúa con las membranas en el transporte de ésteres de ácidos grasos de cadena larga. b. Secuencia canónica de la proteína en *homo sapiens* (1-87), Uniprot: P07108.

Se ha observado que en un cultivo primario de astrocitos, estos secretaron a DBI a través de un camino no convencional a partir de distintos tipos de señales [124,125]. Se ha sugerido también que los astrocitos son una fuente primaria de endozepinas derivadas de DBI [126].

Es necesario destacar que DBI y sus péptidos tienen la capacidad de modular al receptor GABA_A a través de dos caminos independientes y potencialmente cooperativos [112]. Por un lado, DBI, ODN y OP actúan alostéricamente sobre el sitio de unión extracelular de las benzodiazepinas. A partir de estudios de mutagénesis se ha propuesto que DBI se une al sitio de unión de las benzodiazepinas en forma competitiva y así modula directamente la inhibición fásica. Por otro lado, se ha observado que tanto DBI como TTN se unen al receptor periférico de benzodiazepinas (TTN no desplaza a flumazenil, es decir, no se une al receptor GABA_A) [127] produciendo la modulación indirecta. El receptor periférico de benzodiazepinas es una proteína transportadora de colesterol localizada en las membranas externas de las mitocondrias pertenecientes a tejidos neuronales y no neuronales. La unión a este receptor de DBI y TTN regula la producción de neuroesteroides [128], los cuales se unen a los receptores GABA_A, a través de un sitio de unión alostérico localizado en el dominio transmembrana, y regulan la función inhibitoria sináptica y extra-sináptica [129].

Se han propuesto roles como Modulador Positivo [130] y Modulador Negativo del receptor [128,131]; sin embargo aún no se conocen los mecanismos ni las razones por las cuales actúa de una u otra manera. En este sentido, sí fue propuesto que es independiente de la composición de subunidades [130]. Ciertas hipótesis señalan que distintas regiones de DBI y sus péptidos son responsables por una u otra acción y que las distintas concentraciones de los péptidos

determinarían cuál respuesta es la dominante; sin embargo, aún no hay evidencia que las respalde. Estudios muestran efectos pro-convulsivos [121] y ansiogénicos [127] al inyectar ODN en el cerebro. Así mismo, Christian *et al.* [130], demostraron recientemente que un péptido derivado de DBI funciona como regulador de ataques epilépticos en el núcleo talámico reticular (nRt). Tanto ODN como DBI son capaces de desplazar a flumazenil, flunitrazepam y diazepam de su sitio de unión de gran afinidad [112], y se ha estudiado que DBI no modifica la unión de GABA.

Por ser moduladores endógenos, o endozepinas, es muy importante descifrar sus mecanismos de acción ya que esto permitirá comprender un eslabón más acerca de la regulación del SNC [132].

1.6. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo consiste en estudiar distintos aspectos de la estructura y función del receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ a través de métodos *in silico*. Debido a la complejidad de dicha tarea se ha subdividido la tesis en objetivos intermedios que permitan, paso a paso, entender más sobre esta proteína:

- Desarrollar un modelo por homología del receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$.
- Evaluar el modelo realizado, y caracterizar los sitios de unión ortostéricos y el sitio de unión de gran afinidad de las benzodiazepinas, ambos ubicados en el dominio extracelular.
- Analizar la unión de la proteína *Diazepam Binding Inhibitor* (DBI), del Octadecaneuropeptido (ODN) y del Octaneuropeptido (OP) al receptor modelado.

Capítulo 2

Metodología

El modelado computacional comprende un conjunto de métodos que intentan describir en forma simplificada sistemas y procesos reales aplicando principios matemáticos y físicos. Esto permite interpretar datos experimentales, entender mecanismos intervinientes en procesos complejos y realizar predicciones.

A lo largo de este trabajo se emplearon técnicas provenientes de la bioinformática y biofísica computacional. La bioinformática es un área de estudio interdisciplinaria que abarca la biología molecular, la genética, las ciencias de la computación, la física y la estadística, entre otras. Consiste en conceptualizar a la biología en términos moleculares, físico-químicos y luego aplicar la informática para entender y organizar a gran escala la información asociada a ellos. Comprende técnicas como análisis de secuencia de ADN y de proteínas, identificación de homólogos, búsqueda de patrones de secuencia, análisis evolutivos, predicción de estructura, entre otros. La biofísica computacional corresponde al campo en el cual se intenta describir y predecir el comportamiento de sistemas biológicos empleando algoritmos basados en las leyes de la física. La descripción de esta clase de sistemas es altamente compleja debido a la cantidad de átomos involucrados y a la gran variedad de interacciones presentes. La dinámica molecular, las simulaciones cuánticas y los cálculos de energía libre son sólo algunos ejemplos de técnicas de biofísica computacional.

En las secciones siguientes se describen los métodos empleados en este trabajo de tesis. El modelado por homología se realizó empleando el programa Modeller 9.14 [133] y servidores web de alineamiento de estructuras (SSearch [134], PROMALS [135] y SwissModel [136]).

Por su parte, el estudio de los modos de unión de los ligandos y péptidos al receptor se realizó mediante simulaciones de docking molecular a través de los programas HADDOCK [137] y Autodock Vina [138]. La exploración del espacio conformacional del receptor GABA_A en estado APO y en complejo se realizó mediante simulaciones de dinámica molecular clásica utilizando el paquete de programas GROMACS [139–141]. Finalmente se aplicaron técnicas de muestreo avanzado para calcular la energía de interacción de ciertos complejos haciendo uso del programa NAMD2.12 [142].

2.1. Modelado por Homología

Sólo una fracción de las proteínas existentes posee su estructura depositada en la base de datos PDB [6, 7]. Por lo tanto, técnicas alternativas han sido desarrolladas para poder predecir la estructura de aquellas que aún no han podido ser resueltas experimentalmente.

El método de modelado por homología, o comparativo, consiste en crear una representación de la estructura tridimensional de una proteína *incógnita* empleando como referencia o *template* la estructura de otra homóloga que haya sido resuelta experimentalmente. Está basado en la premisa que a lo largo de la evolución, dentro de una misma familia de proteínas la estructura terciaria se encuentra más conservada que la secuencia de aminoácidos [143].

La construcción de un modelo por homología consta de cuatro etapas principales: i. Identificación de las estructuras de referencia; ii. Alineamiento de las secuencias de la proteína incógnita y referencia; iii. Construcción del modelo; y iv. Evaluación de la calidad del modelo. Estos pasos requieren programas específicos integrados con bases de datos de estructuras de proteínas actualizados.

La identidad de secuencia puede definirse como la cantidad de residuos que coinciden exactamente entre dos secuencias diferentes. Se ha estudiado el rango de validez de aplicación de este método, obteniendo como valor crítico el 30% de identidad de secuencia. Ya que de ser inferior, el empaquetamiento de las cadenas laterales en los centros hidrofóbicos de las proteínas no estarían conservados y esto se reflejaría en un descenso de la similitud estructural dentro del plegamiento conservado [12, 143, 144]. No obstante, este valor de corte impide el reconocimiento de homólogos distantes, por lo tanto debe emplearse sólo después de

establecida la homología entre las proteínas, como una medida de la distancia evolutiva [145].

2.1.1. Búsqueda de proteínas homólogas y alineamiento inicial

El punto de partida para realizar un modelo por homología es la búsqueda de secuencias homólogas (vinculadas evolutivamente) que puedan ser empleadas como *referencia* para modelar la proteína en estudio.

Se infiere la homología entre dos secuencias cuando estas comparten más similitud entre sí que con proteínas al azar. Teniendo en cuenta que secuencias homólogas no siempre poseen una alta similitud, cuando una búsqueda encuentra una coincidencia estadísticamente significativa, se puede inferir que son homólogas.

Para tal fin se empleó inicialmente el programa *SSearch* [134, 146]. Éste realiza una búsqueda de similitud local entre la secuencia *incógnita* y secuencias pertenecientes a bases de datos de estructuras de proteínas. En particular, emplea el método de Smith-Waterman [147], que es uno de los más sensibles que existen para búsquedas de similitud. En pasos posteriores se utilizó también el programa BLAST integrado en servidores web, que tiene la ventaja de ser más rápido que el método de Smith-Waterman, aunque menos preciso.

Método de Smith y Waterman

La idea detrás del método consiste en encontrar el menor número de eventos requeridos para convertir una secuencia en otra. En particular, se busca el par de segmentos de cada secuencia tal que su similitud sea máxima. Para ello se crea una Matriz de puntaje H , cuyos casilleros se determinan a partir de la similitud entre dos elementos de la secuencia y de la presencia de deleciones o huecos, penalizados tanto por su creación como por su extensión [147]. La similitud entre dos residuos se obtiene a partir de matrices de sustitución que describen la tasa a la cual un elemento en una secuencia cambia por otro.

Una vez creada la matriz, se encuentra la región de mayor similitud localizando el mayor elemento de H y realizando un proceso de rastreo, hasta encontrar un elemento igual a cero. Este valor se denomina puntaje de similitud y representa la mayor similitud local [134]. Luego, este valor es comparado con aquellos valores obtenidos para alineamientos entre secuencias

de proteínas no relacionadas o aleatorias. Se realiza una regresión lineal simple respecto al logaritmo natural de la longitud de la secuencia del grupo de búsqueda para calcular un puntaje z-normalizado [148].

Dicha distribución de puntajes-z está descrita por la *Distribución de valores extremos*. A partir de esa comparación, el valor que se reporta es el *Valor Esperado* o *E-Value* que es el número esperado de veces que el puntaje obtenido podría ocurrir por casualidad o aleatoriamente. Este valor varía linealmente con el número de secuencias depositado en la base de datos [145]. Una vez que se completó la comparación con todas las secuencias, se obtiene un orden de acuerdo a los mejores puntajes.

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

Este programa es empleado por ciertos servidores web para llevar a cabo la búsqueda de secuencias homólogas. Al igual que el método de Smith-Waterman, realiza una búsqueda local de similitud. BLAST emplea un método heurístico en el cual localiza aciertos de pequeñas regiones (o *palabras*) entre las dos secuencias. A partir de este acierto, el algoritmo localiza cada *palabra* (formada usualmente por tres elementos de la secuencia) en las secuencias de referencia o en bases de datos. Para quedar en el alineamiento las *palabras* deben tener un determinado puntaje, obtenido por comparación mediante una matriz de sustitución (BLO-SUM62). Luego se extiende el alineamiento y se modifica el puntaje. Para ser presentado como resultado deberá ser mayor que un determinado valor indicado por el usuario. Este método es menos preciso que el de Smith-Waterman, pero es mucho más rápido.

Existe una variante denominada PSI-BLAST (*Position-Specific Iterated BLAST*) que emplea los resultados de búsquedas iterativas con BLAST para armar una matriz de puntaje de posición específica, para luego usarla en la búsqueda en bases de datos.

2.1.2. Alineamiento final

El correcto alineamiento es esencial para obtener modelos de calidad. Un solo residuo desalineado puede ocasionar cambios en la orientación relativa de ciertos subdominios o que residuos del sitio activo modifiquen su accesibilidad al solvente [149]. Usualmente este tipo

de errores no puede ser salvado en estadíos posteriores de la simulación.

Los alineamientos de secuencias de a pares, tales como el empleado por *SSearch*, producen estimaciones muy acertadas y estadísticamente significativas, permitiendo encontrar secuencias homólogas. Sin embargo, para obtener información estructural y funcional sobre las regiones más conservadas en la proteína se recomienda realizar alineamientos múltiples de secuencias.

Debido a la importancia de este paso se emplearon dos programas para llevar a cabo el alineamiento de manera tal de comparar los resultados: *PROMALS* (PROfile Multiple Alignment with predicted Local Structure) [135] y *HHpred* [150]. Ambos generan alineamientos múltiples de secuencias de proteínas, mediante el uso de perfiles con información proveniente de bases de datos y predicciones de estructura secundaria, y se diferencian fundamentalmente en el primer paso. *PROMALS* realiza inicialmente un alineamiento rápido de secuencias similares (empleando la matriz de sustitución BLOSUM62 [151]) y con él genera distintos grupos de alineamientos de los cuales toma una secuencia representativa de cada uno, a estas secuencias les realiza un alineamiento y búsqueda de homólogos con PSI-BLAST (empleando la matriz de sustitución uniref90 [152]). Se realiza una predicción de estructura secundaria para estos homólogos no divergentes y toda esta información se deposita en perfiles de Modelos de Markov Ocultos. *HHpred* por su parte realiza en primer lugar un alineamiento con secuencias homólogas a partir de la secuencia *incógnita* mediante múltiples iteraciones de PSI-BLAST [153]. Luego, se obtienen predicciones para la estructura secundaria de dichas secuencias mediante PSI-PRED [154] o bien mediante información de las estructuras tridimensionales con DSSP [155], y es con esta información conjunta que realiza perfiles de Modelos de Markov Ocultos.

Los Modelos de Markov Ocultos, son modelos de secuencias probabilísticos que permiten inferir, a partir de una determinada secuencia de salida, los estados intermedios posibles. Es decir, determina el camino de los estados *ocultos*, donde cada uno posee una determinada probabilidad de ocurrir [156]. Hay potencialmente muchos caminos que podrían generar la misma secuencia, siendo de importancia sólo el más probable. Como todo proceso de Markov la probabilidad en un punto depende únicamente del punto anterior, es decir que no tiene memoria. A partir de los alineamientos múltiples de secuencias se encuentran las matrices

de transición y emisión del perfil, que representan la probabilidad de encontrar, luego de un determinado elemento, un acierto, una inserción, o una deleción. Con estos perfiles de Markov, se realiza un alineamiento con aquellos perfiles obtenidos de las bases de datos, y finalmente se generan los alineamientos.

A modo de comparación se empleó también el servidor web SwissModel [136, 157, 158], que permite obtener modelos por homología en forma automatizada. En este trabajo se emplearon únicamente los resultados de los primeros dos pasos: la búsqueda de secuencias homólogas y el alineamiento de las mismas. Se integraron allí los programas BLAST [159] y HHblits [160] (búsqueda de secuencias de proteínas mediante perfiles de Modelos de Markov Ocultos). Luego la similitud de secuencia fue calculada a partir de la matriz de sustitución normalizada BLOSUM62, como la suma de los puntajes de sustitución dividido por el número de pares de residuos alineados.

2.1.3. Generación del modelo

Una vez que se obtuvo el alineamiento, se procedió a la realización del modelo. Existen principalmente tres métodos para la generación de modelos tridimensionales de proteínas [161]: i. Modelado por ensamble de cuerpos rígidos; ii. Modelado por coincidencia de segmento o reconstrucción de coordenadas; iii. Modelado por restricciones espaciales. En este trabajo se empleó el programa Modeller 9.14 [133] que realiza el proceso de modelado mediante la satisfacción de restricciones espaciales (Figura 2.1). Estas pueden provenir de distintas fuentes, por ejemplo, de la estructura de una proteína homóloga.

En primer lugar se emplea la estructura de referencia para calcular restricciones de distancia y ángulos diedros en la secuencia incógnita. La forma de estas restricciones provienen de un análisis estadístico de las relaciones entre pares de estructuras homólogas provenientes de una base de datos con 416 proteínas cuya estructura tridimensional es conocida [162], es decir que son de origen empírico. Estas relaciones se expresan en una función de densidad de probabilidad (pdf del inglés *probability density function*).

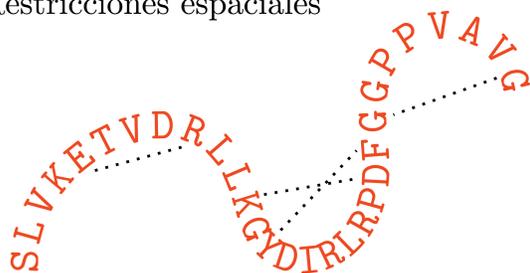
A continuación se combinan en una función los términos de las restricciones espaciales y términos energéticos provenientes del campo de fuerza CHARMM [163] que inducen una estereoquímica adecuada (para la definición de campo de fuerza ver la sección 2.3 en la página

45). Es esta función la que será optimizada en el espacio cartesiano mediante el método de función blanco variable [164] que utiliza a su vez combinaciones de los algoritmos gradiente conjugado (ver sección 2.3.4) y dinámica molecular, con el algoritmo *simulated annealing*¹ (sección 2.3.4). El resultado es una estructura tridimensional que satisface las restricciones espaciales lo mejor posible, conteniendo todos los átomos, excepto hidrógenos, de la cadena principal y las cadenas laterales.

1. Alineamiento

Incognita **SLVKETVDRLLKGYDIRLRPDFGGPPVAV**
Referencia **SFVKETVDKLLKGYDIRLRPDFGGPPVAV**

2. Restricciones espaciales



3. Modelo. Satisface las restricciones espaciales.

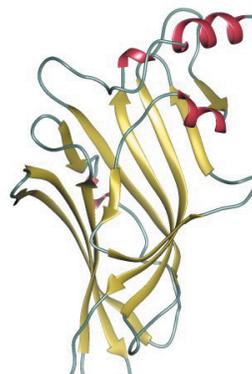


Figura 2.1: Esquema de funcionamiento de Modeller, adaptado de [161].

2.1.4. Evaluación del modelo

Idealmente la calidad de un modelo teórico debería medirse por la similitud estructural con la estructura nativa, la cual se desconoce. Por lo tanto, en general la calidad se estima por comparación con la estructura empleada como *template* y por análisis de ciertas propiedades estructurales generales.

Muchos servidores web ofrecen la posibilidad de evaluar la calidad de las estructuras tridimensionales, los cuales serán descritos en la sección 2.4.

¹En español la traducción sería “Algoritmo de recocido simulado”, pero usualmente se emplea el término en idioma inglés.

2.2. Docking molecular

2.2.1. Introducción

El docking molecular consiste en explorar computacionalmente distintas formas de unión entre dos moléculas, cuya estructura tridimensional es conocida, e intentar así predecir el o los modos de unión y su afinidad. El docking molecular se puede realizar entre una macromolécula y una molécula pequeña (docking proteína-ligando) o entre dos macromoléculas (por ejemplo docking proteína-proteína).

Esta técnica se destaca de los métodos experimentales tradicionales, tales como cristalografía de rayos X, Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y mutagénesis dirigida, por ser más rápido y menos costoso. Actualmente es una técnica simplemente predictiva; sin embargo, es una herramienta clave para la biología molecular ya que tiene aplicaciones en el diseño de fármacos a partir de búsquedas en librerías virtuales de compuestos o “*Virtual Screening*”, en la caracterización de sitios de unión para entender la acción de determinados compuestos y también permite predecir los modos de unión cuando no están resueltos experimentalmente.

El docking consta básicamente de dos partes: un método de búsqueda y una función de puntaje que permite ordenar y clasificar las estructuras encontradas al explorar el espacio de configuraciones [165]. Los modos de unión resultantes quedan completamente definidos por la posición de la molécula móvil, su orientación y su conformación (si fuera flexible).

Los métodos de búsqueda pueden ser sistemáticos o estocásticos. Mientras que en los primeros el muestreo se realiza a intervalos predefinidos y es determinístico, los segundos exploran el espacio en forma aleatoria modificando ciertas variables de estado, hasta cumplir cierta condición determinada por el usuario. Estos métodos también se pueden clasificar según el tipo de exploración del espacio: los métodos globales buscan aquellas configuraciones que presentan un mínimo global de energía en el espacio de búsqueda definido. Por otro lado, los métodos locales simplemente buscan los mínimos energéticos cercanos a la conformación inicial. Idealmente los algoritmos de docking deberían explorar todos los grados de libertad del sistema y encontrar el mínimo global de la energía de interacción entre el sustrato y la molécula. Sin embargo, la capacidad predictiva no es aún suficientemente buena.

Una forma de cuantificar la preferencia de un complejo por una determinada conformación

es a través de la energía libre de unión, que está directamente relacionada con el cálculo de potenciales químicos. Estos contemplan no sólo el perfil energético del sistema (en búsqueda del mínimo) sino que también incluyen términos relacionados con la forma de los sitios de unión y la temperatura del sistema. Los programas de docking expresan de forma aproximada el cálculo de potenciales químicos a través de funciones de puntaje o energéticas. Estas se emplean para clasificar y ordenar las estructuras obtenidas en la búsqueda. Pueden ser empíricas, basadas en campos de fuerza, o basadas en conocimiento (*Knowledge based*).

Realizar un estudio de docking implica no sólo una buena elección del tipo de docking a realizar, sino también de una adecuada preparación de las moléculas involucradas y de un análisis cuidadoso de los resultados obtenidos. Si bien es ideal que la estructura principal esté determinada experimentalmente, se han realizado numerosos estudios de docking molecular sobre modelos realizados por homología. La calidad y fidelidad se verá directamente afectada por el modelo que se emplee.

Existen diversos tipos de programas y algoritmos para realizar el docking molecular. La elección de uno u otro método está sujeta a la información disponible respecto de la interacción y sobre el tipo de moléculas interactuantes. En este trabajo se emplearon AutoDock Vina [138] y HADDOCK [166]. Se utilizaron ya que ambos son gratuitos, eficientes y de uso frecuente para el docking *ciego* [167] y docking *guiado* [168], respectivamente.

2.2.2. AutoDock Vina

AutoDock Vina (ADV) es un programa que predice en forma automatizada la interacción entre ligandos y biomacromoléculas. Emplea una función de puntaje energética simple, permitiendo explorar rápidamente el espacio conformacional incluso para sistemas con muchos grados de libertad.

Los cálculos de docking en este caso consisten en simulaciones independientes. Cada una de ellas comienza con una conformación aleatoria la cual es perturbada. Luego se realiza una optimización local (empleando el algoritmo de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno [169]) con un proceso de selección, en el cual cada paso se acepta o rechaza. Cada optimización local requiere repetidas evaluaciones de la función energética y sus derivadas en función de las coordenadas de posición, orientación y torsión. Mientras que el número de pasos es deter-

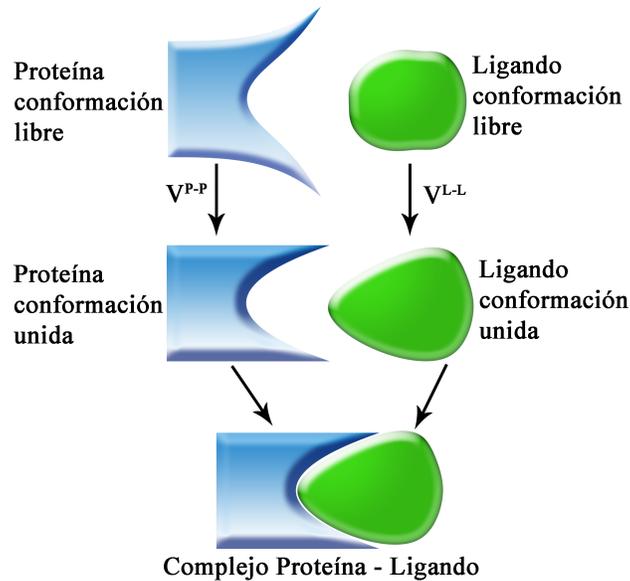


Figura 2.2: Pasos para la evaluación energética de los complejos de docking.

minado heurísticamente (dependiendo del tamaño y flexibilidad del ligando y las cadenas laterales), el número total de simulaciones está determinado por el nivel de exhaustividad fijado por el usuario. Cada simulación produce varios resultados, de los cuales sólo los mejores son retenidos para luego formar parte de los resultados finales, refinados y agrupados [138].

Hay varios puntos a tener en cuenta que pueden originar que no se encuentre la configuración correcta. Por empezar las estructuras originales del ligando y de la proteína deben ser confiables y adecuadas. El modelo de interacción de Ajuste Inducido (*Induced Fit*) predice cambios conformacionales en las moléculas (Figura 2.2). La estructura del receptor empleado debe reflejar entonces el estado con el ligando unido. Por otro lado, el estado de protonación de los residuos es fundamental para un correcto cálculo.

2.2.3. HADDOCK

El programa HADDOCK [137, 170] (High Ambiguity Driven protein-protein Docking) utiliza información experimental sobre la interacción para establecer los mejores modos de unión. La información experimental se incorpora a la simulación como restricciones a interacciones ambiguas. El protocolo de docking consiste en cuatro etapas: i. Orientación de los complejos de manera aleatoria en el sitio de unión; ii. Minimización de la energía tratando

a ambas moléculas como cuerpos rígidos (de esta etapa se obtienen 1000 complejos); iii. Simulación semirrígida de los mejores 200 modelos con el algoritmo *Simulated Annealing* en el espacio de torsión; iv. Refinamiento de los modelos en el espacio cartesiano con agua como solvente explícito. En los dos últimos pasos las cadenas laterales de los aminoácidos pueden moverse libremente.

Las configuraciones finales son agrupadas empleando la desviación cuadrática media en la interfaz y analizado la función energética de HADDOCK (Ec. 2.1). Esta está compuesta por la suma ponderada de términos energéticos (Van der Waals y electrostática) junto a un término empírico de desolvatación y un término asociado a las restricciones (E_{AIRs}).

$$\text{Puntaje}_{\text{HADDOCK}} = 0,2E_{\text{elec}} + 1,0E_{\text{vdw}} + 1,0E_{\text{dsolv}} + 0,1E_{\text{AIRs}} \quad (2.1)$$

En general, el docking Proteína-Péptido o Proteína-Proteína presenta mayor dificultad que el docking de pequeñas moléculas. Esto se debe principalmente a su flexibilidad y el consecuente gran número de grados de libertad. Estudios realizados con HADDOCK [166] han demostrado un muy buen desempeño.

2.2.4. Alcances del método

Como en todo trabajo de investigación, al momento de realizar simulaciones de docking es importante preguntarse cuál es la validez de los resultados obtenidos, teniendo en cuenta que la estructura de partida es un modelo por homología. El análisis será distinto dependiendo del tipo de docking (proteína-ligando, proteína-proteína) y del programa empleado para realizarlo.

En el estudio de docking proteína-proteína con HADDOCK, hay básicamente dos parámetros a tener en cuenta: la identidad de secuencia global (que estará directamente relacionada con la capacidad de reproducir correctamente el plegamiento de la proteína) y la información disponible sobre la interfaz o interacción. De estos dos, se ha observado que el factor más importante es la calidad de la información respecto de las regiones interactuantes. Modelos obtenidos a partir de una baja identidad de secuencia producen buenos resultados de docking ($\text{RMSD} \leq 3,5 \text{ \AA}$) si los datos sobre la interacción son confiables, mientras que modelos

obtenidos con una identidad de secuencia del 60% no producen buenas configuraciones de docking si los datos experimentales no son suficientes o son ambiguos [171].

Por otro lado, de los parámetros a observar *a priori* sobre la calidad del modelo, resulta relevante además el iRMSD² entre el modelo y el *template*, ya que se ha probado que está fuertemente correlacionado con la calidad del docking posterior [171].

El docking proteína-ligando presenta otras problemáticas, ya que ha sido probado que modelos globalmente correctos pueden contener cavidades de unión que no sean adecuadas para la unión del ligando. Los resultados de Bordogna et. al. del 2011 [172] indican que existe una relación entre la precisión en el docking y la calidad global del modelo (representada por parámetros como la identidad de secuencia, RMSD y puntajes de servidores como Mol-Probity); pero hay una mayor correlación con índices de calidad local del sitio de unión en el modelo (identidad de secuencia y RMSD). En este sentido, no existe una relación directa y absoluta entre la calidad global del modelo y la calidad local del sitio de unión.

2.3. Dinámica molecular

2.3.1. Introducción

La dinámica molecular (DM) se basa en describir estructural y dinámicamente la evolución de un determinado sistema mediante la resolución de la ecuación de movimiento de Newton (Ec.2.2) para cada partícula del sistema a través del tiempo. Siendo un método determinístico, permite predecir los estados futuros a partir del estado actual del sistema.

$$\sum_{i=1}^N \mathbf{F}_{ij} = m\mathbf{a}_j \quad (2.2)$$

El resultado es una serie de configuraciones sucesivas, descritas por la posición y velocidad de cada uno de los componentes del sistema, denominadas en su conjunto, trayectoria. A lo largo de una trayectoria el sistema explora los estados posibles en el espacio de las fases.

²*Interface RMSD*: desviación cuadrática media del esqueleto de los residuos ubicados en la interfaz de la interacción. Estos residuos son todos aquellos que se encuentren a una distancia inferior a los 10 Å de cualquier átomo de la otra molécula.

La forma en la que el sistema se mueve en este espacio está gobernada por las ecuaciones de Hamilton:

$$\frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \mathbf{p}_i} \quad (2.3)$$

$$\frac{d\mathbf{p}_i}{dt} = -\frac{\partial \mathcal{H}}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (2.4)$$

donde \mathbf{r} es el vector posición de cada una de las partículas, \mathbf{p} es el vector momento de ellas y \mathcal{H} el Hamiltoniano del sistema.

Si el muestreo es suficientemente extenso y por lo tanto se cumple la hipótesis de ergodicidad (Ec.2.5), entonces se podrá relacionar mediante la mecánica estadística los resultados a nivel microscópico (trayectoria) con observables macroscópicos tales como energía libre, temperatura, capacidad calorífica y presión.

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_{t=0}^{\tau} A(\mathbf{r}^N(t), \mathbf{p}^N(t)) dt = \int \int A(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) \rho(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N) d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N \quad (2.5)$$

A es una determinada propiedad de interés y ρ la densidad de probabilidad.

A diferencia de los métodos cuánticos en los cuales se considera la presencia de los electrones, y por lo tanto son útiles cuando se desea conocer propiedades dependientes de la distribución electrónica (reacciones químicas por ejemplo), la mecánica molecular mantiene una representación clásica e ignora el movimiento de los mismos. La elección de métodos menos o más detallados dependerá siempre de las propiedades y del sistema que se pretenden estudiar, buscando un balance en la eficiencia para resolver las ecuaciones gobernantes y el detalle requerido. La mecánica molecular adopta la aproximación de Born-Oppenheimer, que consiste en considerar en forma independiente el rápido movimiento de los electrones y el relativamente lento movimiento de los núcleos atómicos. En general, el Hamiltoniano para un sistema de partículas puede escribirse como:

$$\mathcal{H} = \mathcal{K}_N + \mathcal{K}_e + V_{NN} + V_{ee} + V_{Ne} \quad (2.6)$$

siendo \mathcal{K}_N y \mathcal{K}_e las energías cinéticas de los núcleos y los electrones respectivamente, y V_{NN} , V_{ee} y V_{Ne} las energías potenciales de interacción núcleo-núcleo, electrón-electrón y núcleo-

electrón.

Mediante la aproximación de Born-Oppenheimer se obtiene que la función de onda para los núcleos $\Psi(\mathbf{R})$ puede expresarse como funciones sólo de las coordenadas de los núcleos \mathbf{R} (Ec.2.7).

$$[\mathcal{K}_N + V_{NN}(\mathbf{R}) + V_e(\mathbf{R})]\Psi(\mathbf{R}) = E\Psi(\mathbf{R}) \quad (2.7)$$

Siendo $V_e(\mathbf{R})$ un potencial efectivo ejercido por los electrones. De esta forma se trabaja solamente con los núcleos de los átomos que conforman el sistema y la fuerza sobre cada uno de ellos puede expresarse en términos de un potencial efectivo V dependiente de las posiciones relativas de las N partículas que lo componen:

$$\mathbf{F}_j = -\nabla_j V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) \quad (2.8)$$

Existen distintas formas de definir dicho potencial, la mecánica molecular emplea potenciales semi-empíricos como se verá a continuación.

2.3.2. Campo de Fuerzas

Los campos de fuerzas permiten describir en forma simplificada la interacción de cada una de las partículas con el resto del sistema. Su principal ventaja es la capacidad de transferencia que poseen, ya que se pueden desarrollar y probar en sistemas simples para luego ser aplicados en problemas más complejos. La forma básica de los campos de fuerza comprende interacciones enlazantes y no enlazantes (Figura 2.3).

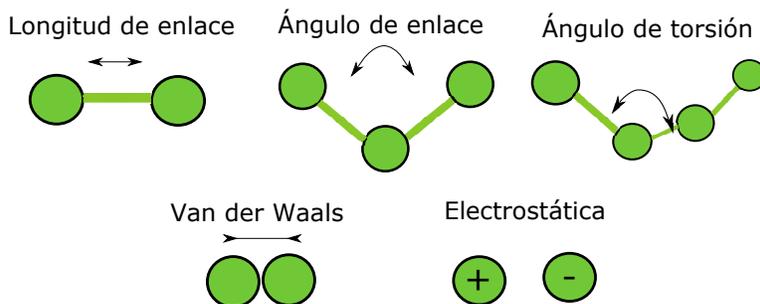


Figura 2.3: Tipos de interacciones representadas en los campos de fuerza.

La ecuación 2.9 representa la forma funcional típica de un campo de fuerzas. Tanto la variación del largo del enlace como el ángulo que forma se encuentran descritos por un potencial armónico, tal que aumenta la energía si los valores se desvían respecto de su valor de referencia. La tercera contribución representa el cambio de energía a medida que rota un enlace (potencial torsional). Por último, el cuarto término representa las interacciones a distancia (o no-enlazantes), calculado entre todos los pares de átomos del sistema separados al menos por tres uniones. Usualmente se emplea el potencial de Coulomb para las interacciones electrostáticas y el de Lennard-Jones para las de Van der Waals.

$$\begin{aligned}
V(\mathbf{r}^N) = & \sum_{\text{enlaces}} \frac{k_{b,i}}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{angulos}} \frac{k_{\theta,i}}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torsiones}} \frac{\nu_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\
& + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \right)
\end{aligned} \tag{2.9}$$

Los campos de fuerza pueden clasificarse de acuerdo al detalle con el que representan los sistemas. Se denominan *All-Atom* a aquellos que modelan explícitamente todos los átomos, *United-Atom* a los que no describen explícitamente a los hidrógenos no-polares (se modifican los parámetros de los átomos pesados a los que está unido el hidrógeno ya que se los toma como un solo átomo) y *Coarse-Grained* a modelos más simplificados, en los cuales grupos de átomos se describen mediante una sola partícula. En este trabajo se emplearon los campos de fuerzas GROMOS53A6 (*United-Atom*) [173], AMBERSS99B (*All-Atom*) [174] y SIRAH (*Coarse-Grained*) [175, 176].

Modelo de agua

Se emplearon distintos modelos de agua de acuerdo a su compatibilidad con los distintos campos de fuerzas utilizados. Las simulaciones con GROMOS53A6 se realizaron con un modelo simple de agua: el SPC (*Simple Point Charge*) (Figura 2.4) [177]. Éste es un modelo rígido de tres puntos.

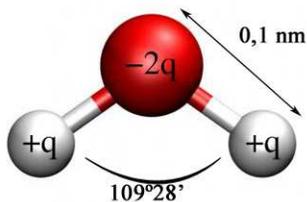


Figura 2.4: Modelo de agua SPC, siendo $q = 0,41$.

En las simulaciones del tipo *All-Atom* se empleó el modelo de agua TIP3P, que también es un modelo rígido de tres puntos. Para las simulaciones *Coarse Grained* se empleó el modelo de aguas WT4 que ha sido desarrollado junto al campo de fuerzas SIRAH [178].

2.3.3. Protocolo adoptado

Resumidamente, el protocolo empleado en las simulaciones de dinámica molecular consiste en: i. Minimización de la energía; ii. Equilibrado del sistema; iii. Simulaciones de producción; y iv. Análisis de los resultados.

La minimización de energía realiza, mediante una modificación sistemática de las posiciones de los átomos, una búsqueda en el espacio energético de la molécula hasta alcanzar un mínimo local. Por otro lado, el equilibrado implica una simulación de dinámica molecular típica, en la cual la segunda ley de Newton se resuelve para cada átomo y determina así su trayectoria. Se pueden realizar distintos tipos de equilibrado: a presión o volumen constante, aumentando gradualmente la temperatura y modificando en distinta medida las restricciones aplicadas sobre determinados grupos de átomos. Cuánto se desea equilibrar estará determinado por el comportamiento de las variables de interés a lo largo del equilibrado. Las simulaciones de producción son aquellas de las cuales se extraerán los datos que serán analizados posteriormente.

2.3.4. Algoritmos relacionados a la dinámica molecular

Minimización de energía

El modelado molecular enfoca su estudio en puntos mínimos de energía potencial, es decir, estados estables. La energía potencial es una función multi-dimensional de las coordenadas, referida como superficie energética. Estas presentan en general varios *mínimos locales* y un *mínimo global* (aquel de menor energía). En el contexto de este trabajo la minimización de energía tiene como objetivo preparar al sistema para la dinámica molecular, eliminando así interacciones desfavorables presentes en la configuración inicial.

Dada una función f , que depende de las variables x_1, x_2, \dots, x_i , se busca los valores de estas tal que f alcance un valor mínimo. En un punto mínimo las derivadas primeras de la función se anulan y las derivadas segundas son valores positivos (Ec. 2.10):

$$\frac{\partial f}{\partial x_i} = 0; \quad \frac{\partial^2 f}{\partial x_i^2} > 0 \quad (2.10)$$

Para encontrar estos puntos existen diversos algoritmos de *Minimización de Energía* clasificados en aquellos que emplean las derivadas de la energía respecto a las coordenadas, y aquellos que no. Los más empleados pertenecen a la primera clase y son el *Steepest descent* y el *Conjugate gradient*. En particular, los mencionados métodos emplean la aproximación a derivada primera. La energía potencial puede escribirse en función del vector \mathbf{r} , como una expansión en series de Taylor alrededor del mínimo:

$$V(\mathbf{r}) = V(\mathbf{r}_k) + (\mathbf{r} - \mathbf{r}_k)V'(\mathbf{r}_k) + (\mathbf{r} - \mathbf{r}_k)^T V''(\mathbf{r}_k) \cdot \frac{(\mathbf{r} - \mathbf{r}_k)}{2} + \dots \quad (2.11)$$

donde \mathbf{r}_k es el mínimo, $V'(\mathbf{r}_k)$ es el vector gradiente (\mathbf{g}_k), que indica la dirección del mínimo y su pendiente, y $V''(\mathbf{r}_k)$ es la matriz Hessiana.

El método de Steepest Descent consiste en modificar las coordenadas de los átomos en forma iterativa hasta encontrar el mínimo. La dirección de los movimientos será paralela a la fuerza neta en el punto ($-\mathbf{g}_k$) y la configuración inicial en cada iteración es la obtenida en el paso anterior. La longitud del primer paso es elegida por el usuario (en este trabajo se empleó $emstep = 0,01$ nm), si las iteraciones llevan a una reducción en la energía entonces el

paso siguiente será aumentado por un factor multiplicativo, caso contrario, se asume que el algoritmo pasó por alto un mínimo y se reduce en un factor multiplicativo el paso siguiente. El gradiente y la dirección de cada paso sucesivo son ortogonales. La minimización concluye cuando la máxima fuerza en el sistema alcanza un determinado valor, o cuando se cumple una determinada cantidad de pasos. Es robusto y de fácil implementación.

Por otro lado, el método de Gradiente Conjugado (*conjugate gradient*), emplea gradientes ortogonales y direcciones conjugadas. Es decir que el sistema se mueve en la dirección \mathbf{v}_k calculada a partir del gradiente y la dirección del paso anterior:

$$\mathbf{v}_k = -\mathbf{g}_k + \gamma_k \mathbf{v}_{k-1} \quad (2.12)$$

siendo γ_k una constante escalar dada por

$$\gamma_k = \frac{(\mathbf{g}_k - \mathbf{g}_{k-1}) \cdot \mathbf{g}_k}{\mathbf{g}_{k-1} \cdot \mathbf{g}_{k-1}} \quad (2.13)$$

Este método es más lento que *Steepest descent* en los primeros pasos, pero se vuelve más eficiente cerca del mínimo.

Simulated Annealing

Es un protocolo (y no un algoritmo en realidad) que tiene como objetivo encontrar la mejor solución a problemas que poseen un gran número de soluciones posibles tales como el análisis de conformaciones. Imita el proceso de *Recocido* (annealing), en el cual la temperatura de una sustancia fundida se reduce hasta que el material cristaliza en un único cristal. Este proceso involucra el cambio, cada cierto número de pasos, de la temperatura de referencia del baño térmico para cada grupo de átomos. Es por ello que se suele emplear también para termalizar el sistema, llevándolo desde una temperatura de 0 K hasta la de simulación (310 K).

Integración de las ecuaciones de movimiento

La descripción de sistemas complejos, como los biológicos, mediante potenciales continuos, implica que los movimientos de las partículas están acoplados entre si, generando así un

problema de más de dos cuerpos que no tiene solución analítica [179]. Es entonces que se recurre al Método de Diferencias Finitas. Este método divide la integración en pequeños pasos de tiempo Δt . La fuerza sobre cada una de las partículas en un determinado tiempo t se calcula como la suma vectorial de las interacciones con el resto de las partículas del sistema y se considera constante durante todo el intervalo. A partir de esta fuerza puede calcularse mediante la segunda ley de Newton (Ec.2.2) la aceleración, la velocidad y posición, para proceder con una nueva integración.

De la variedad de algoritmos existentes, los más empleados son el algoritmo de Verlet [180, 181] y sus variaciones. Entre ellas se encuentra el algoritmo *Leap-Frog*, que es el que se empleó en este trabajo y se caracteriza por calcular las velocidades cada medio paso de tiempo. Se puede definir entonces las relaciones:

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t \mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) \quad (2.14)$$

$$\mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) = \mathbf{v}(t - \frac{\Delta t}{2}) + \Delta t \mathbf{a}(t) \quad (2.15)$$

La velocidad en un tiempo t puede escribirse como:

$$\mathbf{v}(t) = \frac{1}{2} [\mathbf{v}(t + \frac{\Delta t}{2}) + \mathbf{v}(t - \frac{\Delta t}{2})] \quad (2.16)$$

Se lo considera un buen método de integración por conservar la energía y el momento, por ser reversible en el tiempo y permitir un paso de tiempo pequeño.

Constricciones de las distancias

Se puede considerar el comportamiento de las moléculas flexibles como el resultado de la superposición de movimientos diferentes: los de alta frecuencia suelen ser de menor interés que los de baja frecuencia, que generalmente corresponden a cambios conformacionales importantes. Sin embargo, el paso de tiempo de una simulación de dinámica molecular está definido por el movimiento de mayor frecuencia presente en el sistema.

Al momento de realizar simulaciones de DM, es importante elegir un correcto paso de tiempo Δt para integrar las ecuaciones de movimiento. Por un lado, cuando más grande sea

el valor más rápida será la simulación y se cubrirá una mayor parte del espacio de las fases. Pero si es demasiado grande no sólo se perderá información sobre la trayectoria, sino que además aparecerán fuerzas divergentes que harán colapsar al sistema. Usualmente se usa como regla que Δt sea una décima del menor período observado en el sistema. En el tipo de simulaciones que se realizarán en este trabajo las vibraciones de mayor frecuencia son de 10 fs y ocurren en el alargamiento de los enlaces, especialmente entre los átomos de hidrógeno y carbono. Sin embargo, estas vibraciones no suelen afectar al comportamiento del sistema y pueden ser restringidas a su valor de equilibrio mediante distintos algoritmos ³ sin afectar otros grados de libertad. De esta forma, se puede emplear un paso de tiempo de 2 fs sin perjudicar la precisión de la simulación.

El algoritmo más conocido es el SHAKE [182], que emplea restricciones holonómicas sobre las ecuaciones de movimiento y las resuelve mediante el empleo de multiplicadores de Lagrange. Cada restricción es considerada y resuelta individualmente resultando en el posible incumplimiento de las demás restricciones. Por lo tanto se debe iterar la resolución hasta alcanzar un determinado valor de referencia. Se puede aplicar tanto a distancias como ángulos.

Por su parte, el algoritmo LINCS [183] devuelve los enlaces a su correcta longitud luego de una actualización sin restricciones. El método es no-iterativo y consta de dos pasos: i. Se anulan las proyecciones de los nuevos enlaces sobre los anteriores; ii. Se aplica una corrección al largo de los enlaces debido a la rotación (Figura 2.5). LINCS es más rápido que SHAKE y sólo puede ser empleado para restringir la longitud de enlaces.

³Es importante destacar que en inglés existen dos términos con significados distintos *constraints* y *restraints* que se traducen al castellano de la misma forma: como restricciones. Mientras que el primero se refiere a un requerimiento que se fuerza a cumplir exactamente, el segundo representa un incentivo a que adopte valores cercanos al de referencia. En esta sección nos referimos al primer término (*constraints*), mientras que el segundo se empleará en el contexto del equilibrado.

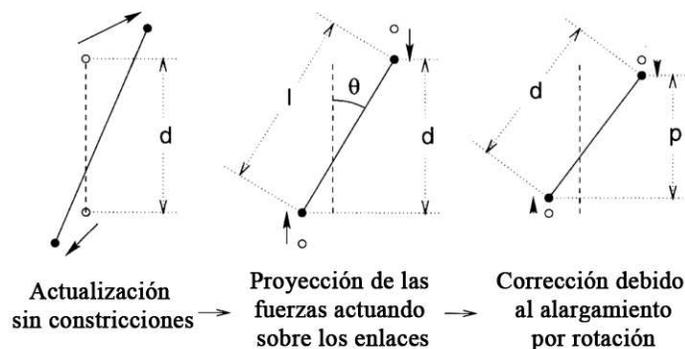


Figura 2.5: Esquema de las tres actualizaciones de la posición de los átomos necesarios para un paso de tiempo mediante el algoritmo LINCS. La línea punteada corresponde al enlace de longitud d , las líneas sólidas son los nuevos enlaces. $I = d \cos(\theta)$ y $p = (2d^2 - I^2)^{1/2}$. La imagen fue adaptada de la publicación de Hess *et. al.* de 1997 [183]

2.3.5. Condiciones periódicas de borde (CPB)

La capacidad de derivar propiedades macroscópicas a partir de simulaciones está estrechamente relacionada con el manejo de los efectos de borde. Las simulaciones de dinámica molecular se llevan a cabo dentro de cajas que pueden presentar distintos tamaños y geometrías (cúbica, triclinica, octaedro truncado, dodecaedro rómbico, y prisma hexagonal). La elección de la forma estará condicionada por la geometría del sistema a simular e intentará minimizar, simultáneamente, el número de moléculas de solvente distantes del soluto ya que conllevan un incremento en el cálculo computacional.

Las condiciones periódicas de borde consisten en representar réplicas del sistema en todas las direcciones, con el objetivo de tener un arreglo periódico similar a las simetrías cristalográficas. Se emplean estas condiciones de borde de manera tal que, simulando pocas moléculas, estas experimenten fuerzas similares a aquellas que sentirían en el seno de un fluido. Así se elimina todo efecto de superficie debido a las dimensiones finitas de la celda: una partícula que deja la caja durante la simulación es reemplazada por su imagen periódica entrando por el lado opuesto (Figura 2.6). Entonces el número de partículas en la caja central permanece constante.

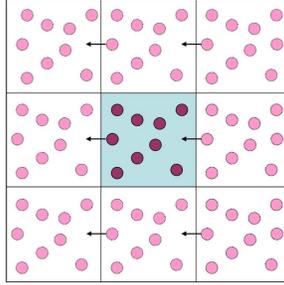


Figura 2.6: Esquema en dos dimensiones de las condiciones periódicas de borde.

El tamaño de la caja deberá ser suficientemente grande de manera tal que la proteína no interactúe con su imagen periódica. Esto estará determinado por el rango de acción de los potenciales involucrados.

2.3.6. Búsqueda de primeros vecinos y descripción de las interacciones no enlazantes

Las interacciones no-enlazantes presentes en los campos de fuerza representan los cálculos que más tiempo insumen, ya que el número de términos a computar es proporcional a N^2 donde N es el número de partículas del sistema.

Las interacciones de Van der Waals, representadas mediante un potencial del tipo Lennard-Jones, son de corto alcance; su valor decrece rápidamente con la distancia ($\sim r^{-6}$). Por lo tanto, es común evitar el cálculo de la interacción entre todas las partículas del sistema mediante distintas técnicas. La más común es el truncado de los potenciales mediante una distancia de *cut-off* (o corte) y aplicar la convención de imagen mínima. Esta nos dice que cada átomo percibe como máximo sólo una imagen de cada átomo en el sistema. Las interacciones para distancias mayores al valor de corte serán tomadas como nulas.

Sin embargo, este método supone también el cálculo de todas las distancias entre pares de átomos para determinar cuales están dentro del valor de corte, acarreando un gran costo computacional. Para solucionar este inconveniente, existen métodos de *búsquedas de vecinos*, como el esquema de Verlet [184] y el esquema de corte basado en grupos, que permiten optimizar el cálculo de estas distancias.

El esquema de Verlet permite almacenar los átomos dentro del radio de corte, junto con

aquellos átomos que se encuentran a una distancia ligeramente mayor a esta. La lista es estática y se actualiza cada cierto número de pasos. Actualmente es el método más eficiente.

En el esquema de grupos, las moléculas de un sistema son subdivididas en grupos y se calcula la interacción entre ellos. Éste método es particularmente bueno para moléculas de agua. Un par de grupos se agregan a la lista de vecinos cuando sus centros geométricos se encuentran dentro de la distancia de corte, hasta que se actualice nuevamente la lista.

Ambos esquemas introducen errores, principalmente debido a la actualización periódica de la lista de vecinos y debido a que aparecen discontinuidades en la energía potencial y las fuerzas cerca del valor de corte. Sin embargo este error suele ser menor a otros presentes en las simulaciones.

Interacciones electrostáticas

Las interacciones electrostáticas, representadas por la ley de Coulomb, son de mayor alcance y por lo tanto introducen grandes errores al ser truncadas. Uno de los métodos más frecuentemente implementados para facilitar el cálculo de estas interacciones es el *Particle Mesh Ewald* (PME) [185, 186].

Está basado en el método de sumatoria de Ewald, en el cual cada partícula interactúa con todas las partículas en la celda de simulación y con todas las imágenes del arreglo periódico infinito. La sumatoria para el potencial es condicionalmente convergente, por lo tanto se divide en dos sumatorias cuya convergencia es más rápida (Ec.2.17): la primera es una serie en el espacio real, la otra en el espacio recíproco. Adicionalmente se le agregan dos términos de correcciones:

$$\begin{aligned}
 V = & \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \sum_{|n|=0}^{\prime} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{\text{erfc}(\alpha |\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|)}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}|} \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{k \neq 0} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{\pi L^3} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{4\pi^2}{k^2} \exp\left(-\frac{k^2}{4\alpha^2}\right) \cos(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_{ij}) \\
 & - \frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \sum_{k=1}^N \frac{q_k^2}{4\pi\epsilon_0} + \frac{2\pi}{3L^3} \left\| \sum_{i=1}^N \frac{q_i}{4\pi\epsilon_0} \mathbf{r}_i \right\|^2
 \end{aligned} \tag{2.17}$$

donde q_i son las cargas de los átomos, erfc es la función error, ε_0 es la permitividad en el vacío, \mathbf{k} son los vectores recíprocos y L es el lado de la caja de simulación. La constante α es elegida lo suficientemente grande de manera tal de despreciar aquellos pares cuya distancia \mathbf{r}_{ij} sea mayor a un determinado valor de corte en el espacio real. La expresión correspondiente al espacio recíproco se aproxima mediante interpolación multidimensional y resolución mediante la Transformada Rápida de Fourier. En consecuencia, el tiempo de computo para este algoritmo es de $N \ln N$.

2.3.7. Control de la temperatura y la presión

Por defecto, los algoritmos básicos de dinámica molecular resuelven las ecuaciones clásicas de movimiento de Hamilton y predicen propiedades en el ensamble microcanónico (NVE). Sin embargo, la mayoría de los experimentos se llevan a cabo a temperatura y volumen o presión constantes (ensambles canónico y NPT, respectivamente). Cada ensamble posee un desarrollo teórico particular y para poder describir datos experimentales se emplean algoritmos de control de temperatura y presión. Existe una gran variedad de algoritmos que llevan a cabo esta tarea. En este trabajo se emplearon los termostatos de Berendsen [187], V-rescale [188], Nosé-Hoover [189,190] y Langevin [191], y los barostatos de Berendsen [187], Parrinello-Rahman [192] y Langevin [193].

GROMACS permite realizar el acoplamiento a los baños térmicos por grupos. De esta forma se asegura que cada uno de los grupos (generalmente proteína, membrana y solvente) se mantengan a la temperatura deseada.

Termostatos

La temperatura de un sistema se encuentra relacionada con la energía cinética a partir del principio de equipartición (Ec. 2.18):

$$\langle \mathcal{K} \rangle_{NVT} = \frac{3}{2} N k_B T \quad (2.18)$$

donde \mathcal{K} es la energía cinética, k_B es la constante de Boltzmann y T la temperatura.

El termostato de Berendsen [187] mantiene la temperatura constante mediante el aco-

plamiento del sistema a un baño térmico externo que actúa como una fuente de energía térmica. Esto se logra multiplicando a las velocidades por un factor λ (Ec. 2.19) en cada paso de tiempo de manera tal que el cambio de temperatura sea proporcional a la diferencia en temperatura entre el baño y el sistema (Ec. 2.20). Así el sistema llega a la temperatura deseada mediante un decaimiento exponencial.

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\Delta t}{\tau} \left(\frac{T_{ref}}{T(t)} - 1 \right) \quad (2.19)$$

$$\Delta T = \frac{\Delta t}{\tau} (T_{ref} - T(t)) \quad (2.20)$$

La constante τ nos indica que el acoplamiento será débil cuanto mayor sea su valor. Se sugiere, para pasos de tiempo Δt de 2 fs, un $\tau \sim 0,8$ ps. Así la temperatura del sistema fluctúa al rededor del valor deseado. Si bien este termostato es altamente eficiente para los pasos de equilibrado, no se aconseja usar en etapas de producción ya que no logra un muestreo adecuado de los ensambles canónicos y NPT. En cambio, los termostatos *V-rescale*, Nosé-Hoover y Langevin sí logran reproducir correctamente los ensambles.

El termostato *V-rescale* [188] es una variación del termostato de Berendsen en el cual se incorpora un término estocástico, continuo en el tiempo (dW), que asegura una correcta distribución de energía cinética. El término estocástico está representado por un proceso de Wiener, donde el valor inicial es nulo y el incremento es una Gaussiana de media 0 y varianza $t - s$ para $0 \leq s < t$. Posee además la ventaja que las desviaciones de la temperatura poseen un decaimiento de primer orden y no hay oscilaciones. El cambio en la energía cinética (\mathcal{K}) en cada paso está dado por la ecuación 2.21:

$$\Delta \mathcal{K} = (\mathcal{K}_0 - \mathcal{K}) \frac{\Delta t}{\tau} + 2 \sqrt{\frac{\mathcal{K} \mathcal{K}_0}{g}} \frac{dW}{\sqrt{\tau}} \quad (2.21)$$

donde g es el número de grados de libertad.

El algoritmo de Nosé-Hoover [189, 190] permite mantener la temperatura promedio del sistema en el valor deseado mediante la incorporación de una variable dinámica adicional s , en las ecuaciones de movimiento, empleando el formalismo de Lagrange extendido [194]. Esta variable extra garantiza que los grados de libertad del sistema representan correcta-

mente al ensamble canónico. Su principal ventaja radica en que todas las ecuaciones son determinísticas y reversibles en el tiempo. La relajación con este termostato es oscilatoria. Las ecuaciones de movimiento de esta formulación (Ec. 2.22, 2.23, 2.24 y 2.25) dependen de las variables del sistema original y del sistema extendido.

$$\frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \frac{\mathbf{p}_i}{m_i} \quad (2.22)$$

$$\frac{d\mathbf{p}_i}{dt} = -\frac{\partial V(\mathbf{r}^N)}{\partial r_i} - \xi \mathbf{p}_i \quad (2.23)$$

$$\xi = \frac{\partial \ln(s)}{\partial t} \quad (2.24)$$

$$\frac{d\xi}{dt} = \frac{1}{M_s} \left(\sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m_i} - gk_bT \right) \quad (2.25)$$

donde s es el factor de escala entre las variables reales y virtuales, M_s es un parámetro de inercia térmica que determina el acoplamiento del termostato (en GROMACS se define a partir del tiempo $\tau = \sqrt{\frac{4\pi^2 M_s}{T_0}}$, propuesto por el usuario), ξ es el coeficiente de fricción termodinámica y g es el número de grados de libertad del sistema extendido ($3N+1$). La ecuación 2.25 representa el balance de energía que incluye las componentes cinética y potencial del reservorio térmico (variable extendida).

El termostato de Langevin [191], o dinámica de Langevin, controla la temperatura mediante la incorporación a las ecuaciones de movimiento de un término estocástico y una constante de fricción (Ec. 2.26 y 2.27) [195].

$$\frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \frac{\mathbf{p}_i}{m_i} \quad (2.26)$$

$$\frac{d\mathbf{p}_i}{dt} = -\frac{\partial V(\mathbf{r}^N)}{\partial r_i} - \gamma_i \mathbf{p}_i + \sqrt{2m_i \gamma_i k_b T} \frac{d\mathbf{W}_i}{dt} \quad (2.27)$$

siento γ_i el coeficiente de fricción y $d\mathbf{W}_i$ un vector de g procesos de Wiener normalizado como $\left\langle \frac{dW_i(t)}{dt}, \frac{dW_j(t')}{dt} \right\rangle = \delta(t - t') \delta_{ij}$.

Barostatos

En las simulaciones que emplean el ensamble isobárico-isotérmico (NPT) la presión se mantiene constante al modificar el volumen de la celda de simulación y las coordenadas atómicas. La fluctuación del volumen está directamente relacionada con la compresibilidad isotérmica κ (Ec. 2.28)

$$\kappa = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \quad (2.28)$$

Al igual que en el termostato, en el barostato de Berendsen [187] la presión se mantiene constante al acoplar el sistema con un baño de presión (Ec. 2.29), re-escalando el volumen en cada paso de tiempo.

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_P} (P_{ref} - P(t)) \quad (2.29)$$

donde τ_P es la constante de acoplamiento y P_{ref} la presión deseada. El volumen de la caja de simulación será escalado por un factor λ que depende del paso del tiempo y la compresibilidad isotérmica (Ec. 2.30) y las nuevas posiciones serán $\mathbf{r}'_i = \lambda^{\frac{1}{3}} \mathbf{r}_i$.

$$\lambda = 1 - \kappa \frac{\Delta t}{\tau_P} (P - P_{ref}) \quad (2.30)$$

Puede aplicarse en forma isotrópica (se modifica por igual en todas las direcciones), o anisotrópica (el factor de escala se calcula independientemente para cada eje).

El barostato de Parrinello-Rahman [192], capaz de simular correctamente el ensamble NPT, aplica una formulación similar al termostato de Nosé-Hoover. Las ecuaciones de movimiento describen el comportamiento de los lados de la caja de simulación (\mathbf{b}) y de las partículas del sistema.

$$\frac{d^2 \mathbf{b}}{dt^2} = V \mathbf{W}^{-1} \mathbf{b}'^{-1} (\mathbf{P}(t) - \mathbf{P}_{ref}) \quad (2.31)$$

$$\frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \frac{\mathbf{p}_i}{m_i} \quad (2.32)$$

$$\frac{d\mathbf{p}_i}{dt} = -\frac{\partial \mathcal{V}(\mathbf{r}^N)}{\partial \mathbf{r}_i} - \mathbf{M} \mathbf{p}_i \quad (2.33)$$

$$\mathbf{M} = \mathbf{b}^{-1} \left(\mathbf{b} \frac{d\mathbf{b}'}{dt} + \frac{d\mathbf{b}}{dt} \mathbf{b}' \right) \mathbf{b}'^{-1} \quad (2.34)$$

donde V es el volumen del sistema, el potencial se representa aquí como \mathcal{V} para diferenciarse del volumen, W determina la intensidad del acoplamiento y los valores primados corresponden a las matrices transpuestas. Puede definirse $\mathbf{W}_{ij}^{-1} = \frac{4\pi^2\kappa_{ij}}{3\tau_P L}$ en función de la compresibilidad isotérmica κ , la constante de tiempo (τ_P) y del mayor elemento de la caja (L). En la mayoría de los casos el barostato de Parrinello-Rahman se emplea en conjunto con el termostato de Nosé-Hoover para realizar las simulaciones de producción, previo equilibrado con los algoritmos de Berendsen.

NAMD ofrece además un método para controlar la presión denominado *Nosé-Hoover Langevin piston pressure control*, en el cual se emplea el método extendido de Nosé-Hoover [193] aplicando la dinámica de langevin para controlar las fluctuaciones de presión en el barostato [196]. Permite, al combinarse con el termostato de Langevin, simular en el ensamble NPT. Se introduce a las ecuaciones de movimiento un grado de libertad extra, correspondiente al volumen de la caja V (Ecuaciones 2.35, 2.36, 2.37). La energía cinética de este grado de libertad es equivalente a un pistón actuando en el sistema, el cuál también tiene una energía potencial asociada.

$$\frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \frac{\mathbf{p}_i}{m_i} + \frac{dV}{dt} \frac{1}{3V} \mathbf{r}_i \quad (2.35)$$

$$\frac{d\mathbf{p}_i}{dt} = -\frac{\partial\mathcal{V}(\mathbf{r}^N)}{\partial\mathbf{r}_i} - \frac{dV}{dt} \frac{1}{3V} \mathbf{r}_i - \gamma\mathbf{p}_i + W(t) \quad (2.36)$$

$$\frac{d^2\mathbf{V}}{dt^2} = -\frac{1}{M} (P(t) - P_{ref}) - \gamma_V \frac{dV}{dt} \frac{1}{3V} + \frac{W_V(t)}{M} \quad (2.37)$$

tal que V es el volumen de la caja de simulación, M la masa $3N\tau^2k_B T$, τ el periodo de oscilación, γ es la frecuencia de colisión de los átomos del sistema y γ_V la del pistón, W y W_V las funciones de ruido para el sistema y el pistón respectivamente. Estas son distribuciones gaussianas con media nula y varianzas $\langle W(t), W(t') \rangle = \delta(t-t')2\gamma k_B T/m$ y $\langle W_V(t), W_V(t') \rangle = \delta(t-t')2\gamma_V k_B T/M$. El usuario especifica la presión deseada y los tiempos de oscilación y decaimiento del pistón. En este caso no se precisa la compresibilidad isotérmica.

2.4. Herramientas de análisis

El análisis de los resultados obtenidos y la realización de cálculos complementarios se llevó a cabo mediante herramientas computacionales adicionales que se detallan a continuación.

Herramientas de Visualización

Las simulaciones de dinámica molecular permiten analizar cambios conformacionales a lo largo del tiempo. Una de las formas más simples de analizar dichos cambios es a través de *películas* (secuencia de archivos con la posición de cada uno de los átomos) reproducidas mediante programas de visualización. Esto permite tener una idea del espacio de las configuraciones explorado en cada simulación, las cuales se correlacionan con la evolución temporal a partir del teorema ergódico. En esta tesis se emplearon los programas VMD [197, 198] y Chimera [199] tanto para visualizar las trayectorias como para crear las imágenes aquí publicadas.

Análisis de estructuras

Analizar la calidad estructural de los modelos es fundamental y puede realizarse con un gran abanico de programas y servidores web. En este trabajo se empleó una combinación de los programas VMD, Chimera, Coot [200] y los servidores web Molprobity [201], Procheck [202] y Q-Mean [203].

Los C_α son los puntos más importantes para evaluar la distorsión de la geometría en estructuras de proteínas ya que aquí se conectan las cadenas laterales con el esqueleto de la proteína. El gráfico de Ramachandran [204], a través del análisis de ángulos diedros, constituye una buena medida de la calidad estructural. El gráfico representa la combinación de ángulos diedros Phi y Psi para cada residuo de la proteína. Dichas combinaciones podrán estar localizadas dentro de regiones *favorables* (es decir, que ha sido demostrado en estudios que ese par de ángulos es frecuente) o no. Sin embargo, en muchos casos este criterio no es suficiente y también se debe tener en cuenta los rotámeros de las cadenas laterales y los ángulos diedros del C_β , que también poseen preferencias por ciertos valores [205].

Molprobity permite agregar hidrógenos, optimizar las redes de puentes de hidrógeno y controlar las cadenas laterales de Asparagina, Glutamina e Histidinas. Además analiza la geometría y los contactos de cada uno de los átomos, identificando el número de sobreposiciones estéricas ($> 0,4 \text{ \AA}$), evalúa los rotámeros, realiza gráficos de Ramachandran identificando aquellos aminoácidos que se encuentran dentro de las regiones probables, computa las desviaciones de los carbonos β , y las distancias y ángulos de enlaces por fuera de los valores esperados.

PROCHECK realiza un análisis estadístico de la calidad estereoquímica de la estructura proteica. El estudio incluye estadísticas respecto del gráfico de Ramachandran, los ángulos diedros adicionales y, el largo y ángulo de los enlaces. Los resultados son expresados en función de porcentajes y *G-factors*. Estos últimos son una medida de que tan inusual es una determinada propiedad estereoquímica. PROCHECK calcula estos valores basándose en el análisis de 163 estructuras de alta resolución, no homólogas, obtenidas mediante cristalografía de rayos X con una resolución superior a los 2 \AA y un factor R menor al 20 %, y los resultados de Engh y Huber, 1991 [206]. Valores inferiores a -0,5 son considerados inusuales y menores a -1 muy inusuales.

QMEAN (*Qualitative Model Energy ANalysis*) [203], por su parte, estima a partir de propiedades geométricas la calidad global y local del modelo. El *z-score* da una idea de la similitud del modelo a la estructura nativa. Se compara el puntaje QMEAN con aquellos obtenidos en estructuras de similar tamaño resueltas experimentalmente. Un modelo será mejor cuanto más cercano sea su *z-score* a cero [207]. QMEAN consiste en cuatro términos individuales: i. Potencial de interacción entre los C_β ; ii. Potencial de interacción entre todos los átomos; iii. Potencial de solvatación; y iv. Potencial de ángulos de torsión.

Parametrización de ligandos

Los estudios de docking requieren conocer los parámetros que describen a los ligandos y su interacción con otros átomos. Se emplearon tres programas/servidores web para dicha tarea: ATB (*Automated Topology Builder*) [208], ACPYPE [209] y PRODRG [210].

ATB [208] emplea una combinación de cálculos cuánticos y enfoque basado en el conocimiento para determinar los parámetros. Se pueden cargar moléculas nuevas o bien descargar

las que se encuentran en su repositorio. El protocolo consiste en una optimización inicial a nivel semi-empírico, luego se re-optimizan mediante la aplicación de DFT (Teoría del funcional de la densidad) con potencial híbrido (B3LYP) y base 6-31G* con aguas implícitas. De esta estructura se calcula el potencial electrostático y las cargas parciales. El último paso consiste en un refinamiento de los términos de distancias y ángulos de enlace mediante el cálculo de la matriz Hessiana.

ACPYPE (*AnteChamber PYthon Parser interfacE*) [209, 211] es una interfaz para la creación de topologías con el programa Antechamber [212]. Los parámetros para los compuestos están basados en el campo de fuerza *General Amber Force Field* (GAFF) y deben ser empleados junto a un campo de fuerza AMBER. Identifica enlaces y tipos de átomos, analiza la equivalencia entre los átomos del compuesto y los existentes en el campo de fuerza, genera archivos de topología para los residuos, y de no encontrar parámetros particulares, emite sugerencias razonables.

PRODRG [210] genera topologías, para ser empleadas en distintos programas de simulación, y archivos estructurales, a partir de una estructura inicial de la molécula. Así mismo, realiza opcionalmente una minimización de energía. Trabaja dividiendo a la molécula en grupos de carga conocidos, los cuales poseen asignado un valor de carga entero. Este programa es empleado por el webserver HADDOCK y fue además empleado, en este trabajo, para obtener los archivos estructurales para realizar las simulaciones de DM.

Modos Normales

El análisis de modos normales en macromoléculas biológicas permite analizar los movimientos a gran escala (o movimientos colectivos) que realiza la estructura. Estos movimientos pueden correlacionarse con cambios conformacionales relevantes para la funcionalidad de las mismas [213]. El análisis de modos normales permite expresar la dinámica del sistema como una superposición de variables colectivas: las coordenadas de los modos normales alrededor de un mínimo. En el 50% de los casos en los cuales existen al menos dos conformaciones para la estructura de una proteína, el movimiento relativo se puede describir con uno o dos modos normales de baja frecuencia [214].

El cálculo de modos normales está basado en la aproximación armónica de la función

energía potencial alrededor de un mínimo conformacional. Esta aproximación permite la solución analítica de las ecuaciones de movimiento mediante la diagonalización de la matriz Hessiana (compuesta por las derivadas segundas de la energía potencial sopesando la masa). Los modos normales son los autovectores de esta matriz, cuyos autovalores representan el cuadrado de las frecuencias de los modos. Se empleó para este análisis el servidor web elNémo [215].

elNémo emplea el método de *Elastic Network Model* (ENM) para calcular los modos normales de baja frecuencia de macromoléculas a partir de una estructura *all-atom* en formato *.pdb*. El programa permite analizar la colectividad de los modos, observar animaciones de ellos, ver las mayores fluctuaciones, comparar los factores β calculados y los experimentales (para observar la diferencia en flexibilidad respecto a la conformación cristalográfica).

Herramientas de análisis de datos

Para finalizar, GROMACS cuenta con diversos sub programas que brindan la posibilidad de analizar distintos aspectos de las estructuras y simulaciones. Estos incluyen *g_rms* para calcular la desviación cuadrática media, *g_rmsf* para obtener la fluctuación cuadrática media de los residuos en las simulaciones, *g_energy* que informa variables macroscópicas como temperatura y presión, *g_cluster* que permite agrupar las estructuras obtenidas de la trayectoria en función de su RMSD, y *g_filter* aplica un filtro pasa-bajos a la simulación reteniendo únicamente los movimientos de menor frecuencia.

2.5. Técnicas de muestreo avanzado

Las simulaciones de Dinámica Molecular son ampliamente usadas en distintos campos de la ciencia. Sin embargo, los resultados obtenidos sólo poseen sentido si la simulación es suficientemente larga de manera tal que el sistema pueda recorrer todas las configuraciones energéticamente relevantes (es decir, si se cumple la ergodicidad del sistema en la escala de tiempo de la simulación). Muchas veces esta condición no se cumple ya que las conformaciones relevantes se encuentran separadas por barreras energéticas demasiado altas o bien el sistema difunde muy lentamente en el espacio de las configuraciones. Afortunadamente, las

denominadas técnicas de muestreo avanzado permiten solucionar este problema [216].

Entre dichas técnicas existe un subtipo en el cual el muestreo es facilitado mediante la adición de un potencial adicional que actúa en ciertos grados de libertad a través de las denominadas *variables colectivas* (VC); en este trabajo se empleó el método *Adaptive Biasing Force*.

2.5.1. Adaptive Biasing Force - ABF

El método de *Adaptive Biasing Force* forma parte del conjunto de algoritmos diseñados para calcular la diferencia de energía libre entre dos estados físicos mediante transformaciones geométricas. A diferencia de las denominadas transformaciones alquímicas, que modifican continuamente las especies químicas para obtener otras distintas [217], éstas contemplan modificaciones geométricas a través de variables colectivas cuidadosamente seleccionadas. Las variables colectivas son coordenadas generalizadas cuya evolución puede ser descrita mediante las ecuaciones de movimiento de Hamilton. Las mismas pueden representar desde cambios en los grados de libertad internos de las moléculas hasta fenómenos de reconocimiento y asociación [218].

La idea detrás de esta metodología es mejorar la eficiencia de las simulaciones de dinámica molecular en las cuales la superficie de energía potencial es muestreada en forma ineficiente debido a altas barreras energéticas. Para ello se le incorpora a las ecuaciones de movimiento a lo largo de la simulación una fuerza sesgada que se actualiza a cada paso, de manera tal de obtener para tiempos suficientemente largos un Hamiltoniano que no contenga la fuerza promedio actuando a lo largo de la coordenada de interés [219]. Se denomina coordenada de reacción a aquellos parámetros geométricos unidimensionales que miden el progreso de una reacción [220]. Son funciones explícitas de las coordenadas del sistema y representan los grados de libertad del sistema a lo largo de los cuales se encuentran dichas barreras energéticas. Es fundamental elegir las variables colectivas correctas que describan los eventos lentos del sistema para que los cálculos converjan y los valores de la energía libre obtenidos sean confiables.

La energía libre a lo largo de una coordenada de reacción puede ser descrita como el potencial resultante de una fuerza promedio actuando sobre esta coordenada (de ahí el

nombre de Potencial de Fuerza Media, o PMF). Esta relación entre la fuerza actuando en la coordenada de reacción y la derivada de la energía libre $\frac{\partial G(\xi)}{\partial \xi}$ ha sido probada teniendo en cuenta la influencia del muestreo del espacio de configuraciones [221]. La fuerza media a lo largo de la coordenada de reacción ξ (Ec.2.38) se estima a partir del promedio tomado en un pequeño intervalo.

$$\langle F_\xi | \xi^* \rangle = -\frac{\partial G(\xi^*)}{\partial \xi} \quad (2.38)$$

La fuerza puede ser calculada dividiendo el rango de variación de la coordenada de transición en pequeños intervalos. Si se denominan $\mathcal{N}(N_{step}, k)$ al número de muestras recolectadas en el intervalo k luego de N_{step} pasos de simulación, entonces la fuerza queda definida como:

$$\mathbf{F}_\xi(N_{step}, k) = \frac{1}{\mathcal{N}(N_{step}, k)} \sum_{i=1}^{\mathcal{N}(N_{step}, k)} \mathbf{F}_i(t_i^k) \quad (2.39)$$

donde $\mathbf{F}_i(t_i^k)$ es la i -ésima fuerza muestreada cuando la variable se encuentra en el intervalo k y t_i^k es el tiempo en el cual dicha fuerza fue muestreada, tal como se muestra en la ecuación Ec.(2.40)

$$\mathbf{F}_i(t_i^k) = \left. \frac{d}{dt} \left(M_\xi \frac{d\xi}{dt} \right) \right|_{t_i^k} \quad (2.40)$$

Luego se aplica una fuerza externa de forma $-\langle F_\xi | \xi^* \rangle \nabla \xi$ que se opone a la fuerza promedio. Este procedimiento resulta en la obtención, luego de una pequeña equilibración, de una fuerza promedio actuando en dicha coordenada cercana a cero. De esta forma, el sistema puede desplazarse a lo largo de la coordenada de transición en forma difusiva, sin barreras energéticas y por lo tanto su muestreo se vuelve uniforme [222]. A partir del cálculo de esta fuerza es que se reconstruye la energía libre $G(\xi)$ empleando el método de Integración Termodinámica. Así la diferencia de energía libre entre dos estados a y b del sistema $\Delta G_{a \rightarrow b}$ se obtiene a partir de la ecuación 2.41 suponiendo un único parámetro ξ .

$$\Delta G_{a \rightarrow b} = - \int_{\xi_a}^{\xi_b} F_\xi d\xi \approx -\frac{\xi_b - \xi_a}{k_{max}} \sum_{k=1}^{k_{max}} F_\xi(N_{step}, k) \quad (2.41)$$

La variación de energía libre debería ser determinada idealmente a partir de N simulaciones independientes.

Capítulo 3

Parte I: Modelado del Receptor

GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$

3.1. Objetivos

- Obtener un modelo del receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$.
- Evaluar el modelo según propiedades estereoquímicas.
- Describir sus modos esenciales.
- Analizar la estabilidad del modelo mediante simulaciones de dinámica molecular atomísticas y de grano grueso, contemplando además su entorno acuoso y la membrana celular.

3.2. Métodos

3.2.1. Modelado por homología

Se eligió el subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ para modelar ya que es el más estudiado a nivel fisiológico y farmacológico, y por lo tanto existe abundante información experimental sobre su funcionalidad e interacción con ligandos, lo cual permitió la contrastación de los resultados de los métodos computacionales.

El primer paso para realizar el modelo por homología fue la búsqueda de las secuencias de las subunidades α_1 , β_2 y γ_2 de humano en la base de datos de Uniprot [223]: P14867, P47870 y P18507, respectivamente. Luego, para cada subunidad, se realizó una búsqueda de secuencias homólogas con SSearch [134]. Se empleó para la búsqueda la base de datos *PDBe Protein Structure Sequences* y la matriz de sustitución BLOSUM50, que se emplea para detectar homólogos distantes y posee relativamente bajas penalidades para residuos distintos. Se adoptó una penalidad de -10 para la apertura de un *gap* y -2 para su extensión. Se computaron 50 alineamientos y puntajes. El mayor *Valor Esperado* posible se determinó en 10. Estos son los valores por defecto en el servidor web.

Las dos estructuras con mejor puntaje fueron el receptor GABA_A homopentámero de subunidades β_3 de humano (PDB ID: 4COF) [2] y el receptor de Glicina homopentámero de subunidades α_3 de humano (PDB ID: 5CFB) [40]. Ambos se encuentran en un estado cerrado, sin embargo se diferencian en que el receptor GABA_A está en el estado desensibilizado y posee el agonista benzamidina unido en cada uno de sus cinco sitios de unión, mientras que el receptor de Glicina posee antagonistas unidos. En cuanto al porcentaje de identidad de secuencia entre las estructuras cristalizadas y las subunidades a modelar, PDB ID: 4COF presenta mayor porcentaje de identidad: 40,8 % con α_1 , 91,1 % con β_2 y 43,2 % con γ_2 ; en contraste con PDB ID: 5CFB que comparte 41,52 % con α_1 , 45,4 % con β_2 y 41,84 % con γ_2 .

Otro aspecto a tener en cuenta al momento de elegir el *template* es la calidad con la que están resueltas las estructuras. Los dos sistemas poseen una resolución similar, siendo 2,97 Å para PDB ID: 4COF y 3,04 Å para PDB ID: 5CFB. Por lo tanto, la resolución no fue determinante en la selección y se eligió la estructura del receptor homopentámero GABA_A como plantilla, priorizando el porcentaje de identidad de secuencia.

A continuación se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias de las subunidades a modelar con la secuencia de la subunidad β_3 y secuencias de otros miembros de la familia empleando distintos programas: PROMALS [135], HHPRED [150] y Swissmodel [136, 157, 158]. Los resultados de los tres servidores fueron comparados, encontrando discrepancias únicamente en la alineación del loop F de la subunidad α_1 . En esta región se realizaron ajustes manuales de dos *gaps* para ajustar el alineamiento con información experimental [1]. Además fue necesario modificar la región intracelular (ICD), la cual fue

reemplazada por el conector -SQPARAA-, el mismo que fue empleado para obtener la estructura cristalográfica del receptor [2]. En el proceso del modelado por homología, el correcto alineamiento de las secuencias es fundamental para obtener resultados de calidad. Es por eso, que una cuidadosa evaluación de los mismos fue realizada para detectar posibles errores producto de los algoritmos empleados.

La confección de los modelos fue realizada mediante el software Modeller 9.14 [133] empleando el tipo de modelado “Automodel”, que incluye en el modelo restricciones espaciales obtenidas del alineamiento. Se empleó el nivel más exhaustivo de refinamiento, “refine slow”. 500 modelos fueron realizados y calificados según dos funciones: DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*) [224] y *Modeller Objective Function* (molpdf).

Se inspeccionaron visualmente los mejores 20 modelos según estas dos funciones para detectar posibles errores. El mejor modelo se seleccionó como aquel con la mayor cantidad de residuos en la región más favorable del gráfico de Ramachandran (Figura 3.2). También se tuvieron en cuenta los resultados de evaluación estructural obtenidos mediante los servidores web Q-mean [203] y PROCHECK [202].

El modelo elegido fue refinado con el programa Coot [200] que ofrece distintas herramientas para la optimización de rotámeros e interacciones entre cadenas laterales. Se empleó el programa PROPKA a través de su servidor web [225–227] para asignar los estado de protonación de los residuos (a pH fisiológico) y optimizar las redes de puentes de hidrógeno.

3.2.2. Modos Normales

Se analizaron los modos normales del modelo a través del servidor ElNémo [215]. Para el cálculo de los 20 primeros modos se emplearon sólo los C_{α} . Para los otros parámetros fueron empleados los valores por defecto.

3.2.3. Simulaciones de dinámica molecular

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para analizar la estabilidad del modelo. En primer lugar se simuló atomísticamente al receptor modelado, embebido en una membrana de POPC (palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholina), rodeado por solvente explícito. Este

sistema, así como también uno formado por el receptor cristalizado (PDB ID: 4COF), fueron simulados posteriormente empleando un campo de fuerza de grano grueso.

Simulaciones atomísticas

Se eligió el campo de fuerzas GROMOS53A6 [173] para describir la proteína, y el modelo de aguas SPC [177] para el solvente. Se incorporaron contra-iones para neutralizar la carga del sistema y se agregaron iones de sodio y cloruro para obtener una concentración efectiva de 0,15 M. En todas las simulaciones el receptor GABA_A fue insertado en una membrana de 648 moléculas de POPC pre-formada y pre-equilibrada empleando *MemBuilder* [228]. Se eligió este fosfolípido principalmente porque ha sido usado previamente en simulaciones de dinámica molecular de receptores de la misma familia [229,230]. Se emplearon los parámetros de Berger para caracterizar los fosfolípidos [231].

El sistema fue colocado en una caja ortorrómbica de dimensiones 14,0 x 14,0 x 16,5 nm³ de forma tal que los átomos pertenecientes a la proteína y a los ligandos no fueran afectados por sus imágenes. Los sistemas completos (de aproximadamente 210.000 átomos) fueron sometidos en primer lugar a una minimización de energía empleando el algoritmo *Steepest Descent*, hasta alcanzar una fuerza de 500 kJ/mol.nm, empleando como paso inicial 0,01 nm. Seguidamente, los sistemas fueron sometidos a una termalización, en la cual se aumentó progresivamente su temperatura desde 0 K hasta alcanzar los 310 K en 500 ps mediante el algoritmo *Simulated Annealing*. Esta simulación fue realizada a presión constante debido a la presencia de la membrana, ya que estos sistemas son inestables en simulaciones en el ensamble canónico. Adicionalmente, se aplicaron restricciones al movimiento del átomo P8 (fosfato) de los fosfolípidos, de manera tal de asegurar que estos se mantengan en el plano de la membrana. La constante de fuerza empleada para la restricción fue de 1000 kJ/mol.nm².

El segundo paso de equilibrado consiste en simulaciones de 10 ns en el ensamble NPT aplicando restricciones sólo al movimiento de los átomos pesados de la proteína, permitiendo una relajación de las interacciones con el solvente y con la membrana. Durante el equilibrado se emplearon el termostato y barostato de Berendsen [187], ya que permiten equilibrar el sistema eficientemente.

Finalmente se realizaron las simulaciones de producción de 100 ns. La temperatura se

mantuvo constante a 310 K mediante el empleo del termostato de Nosé-Hoover [189, 190], empleando una constante de acoplamiento de $\tau=0,8$ ps, y la presión en 1 bar mediante el baróstato de Parrinello-Rahman [192] con una constante de acoplamiento de $\tau=10,0$ ps y una compresibilidad de $4,5 \cdot 10^5$ bar.

Las interacciones de Van der Waals se limitaron mediante un valor de corte de 1,2 nm y se empleó el algoritmo PME [185, 186] para los cálculos de interacciones electrostáticas, también con un valor de corte de 1,2 nm. La frecuencia de actualización de vecinos se estableció en 10 pasos, mediante el método GRID, con un corte de 1,2 nm. El algoritmo de Verlet [184] se utilizó para la búsqueda de vecinos, mientras que las longitudes de los enlaces fueron restringidas mediante el código LINCS [183].

Simulaciones de grano grueso

Se empleó el campo de fuerzas SIRAH para simular el modelo del receptor y la estructura experimental del homopentámero, nuevamente en un entorno acuoso y embebidos en una membrana de POPC. Cada una de las simulaciones fue de 1 μ s. El paso de tiempo empleado, al ser simulaciones de grano grueso, fue aumentado hasta 20 fs.

El protocolo seguido para estas simulaciones fue elaborado en conjunto con los desarrolladores del campo de fuerzas y consistió en una minimización inicial de la energía con el algoritmo *Steepest Descent* hasta alcanzar una fuerza menor a 100 kJ/mol.nm con un paso inicial de 0,05 nm; un equilibrado de 10 ns en el ensamble NPT con restricciones al movimiento iguales a las aplicadas en las simulaciones atomísticas; y finalmente las simulaciones de producción de 1 μ s. Para el equilibrado se emplearon el termostato *V-rescale* y el barostato Berendsen, mientras que en la producción se emplearon *V-rescale* y Parrinello-Rahman. La distancia de corte para los primeros vecinos fue de 1,4 nm. El análisis de las simulaciones realizó mediante el paquete SIRAH tools [232].

3.3. Resultados

3.3.1. Desarrollo y evaluación del modelo

El primer paso para confeccionar el modelo fue la creación del alineamiento de secuencias. En la Figura 3.1 se puede observar el resultado final del alineamiento entre las subunidades α_1 , β_2 , γ_2 y β_3 . Los dominios modelados, el ECD y TMD, están constituidos por 333 residuos en α_1 y 332 en β_2 y en γ_2 . Se incluyeron en el modelo las hélices α del extremo N-terminal del receptor, las cuales son importantes para la expresión de los receptores en la superficie celular [233].

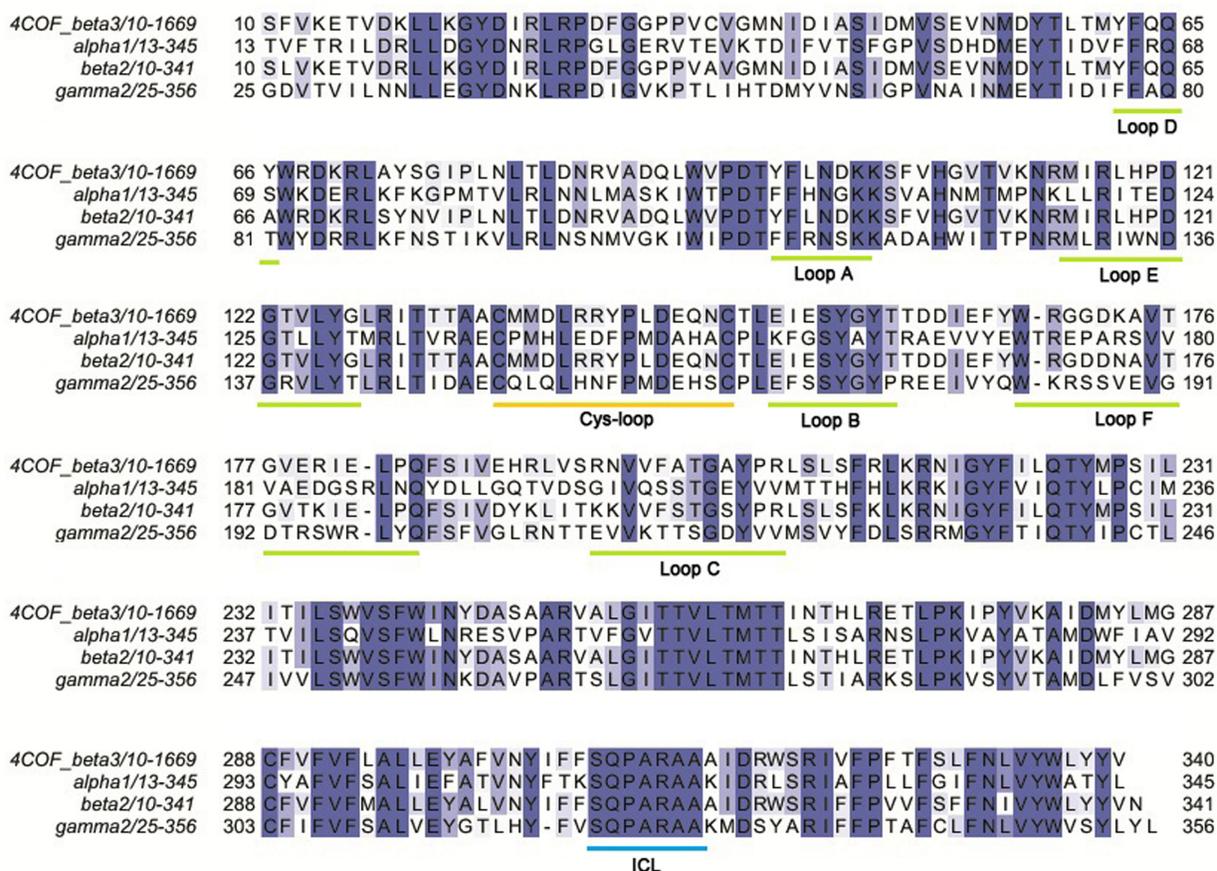


Figura 3.1: Alineamiento de la subunidad β_3 de humano (4COF) con las tres subunidades α_1 , β_2 y γ_2 del receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABA_A de humano. La numeración de la secuencia corresponde a las proteínas en su forma madura. Los residuos están coloreados de acuerdo al porcentaje de identidad con la secuencia consenso. El azul oscuro representa una identidad del 80 % o más, el azul se corresponde con más del 60 %, mientras que el celeste representa una identidad superior al 40 %. Los *loops* que forman los sitios de unión están subrayados en color verde, mientras que el emblemático *Cys-loop* con amarillo. El conector intracelular está señalado con las siglas ICL (Intra-cellular Loop) y subrayado en color celeste.

El modelo final fue elegido de las 500 estructuras iniciales considerando parámetros estructurales, tales como distancias y ángulos de enlace, y ángulos diedros, y los resultados de servidores web de evaluación de estructuras. Los resultados obtenidos con el programa Q-mean (Sección 2.1.4) muestran que el modelo elegido es levemente mejor que un reconocido modelo previo [1], y aceptable en relación a la estructura cristalográfica (Tabla 3.1). Esto se determina mediante el *Z-score*, que será más cercano a cero cuanto mejor sea el modelo.

Tabla 3.1: Puntajes Q-mean y Z-score correspondientes al modelo presentado en este trabajo, un modelo previo [1] y la estructura cristalizada 4COF.

Estructura	Q-mean	Z-score
Modelo	0,572	-2,11
Modelo previo	0,507	-2,88
Estructura cristalográfica	0,581	-2,04

Así mismo, el gráfico de Ramachandran (Figura 3.2) confirma la buena calidad de la geometría del esqueleto del receptor, con un 99,8% de los aminoácidos en las regiones favorables. El 94,2% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables, 5,6% en las regiones permitidas adicionales y 0,2% en las zonas generosamente permitidas. En este modelo ningún aminoácido presenta combinaciones de ángulos diedros prohibidas.

Los *G-factors* correspondientes a parámetros estereoquímicos (ángulos diedros, largo de enlaces y ángulo de enlaces) fueron obtenidos y analizados con el servidor web PROCHECK (Sección 2.4). Estos índices muestran que el modelo mantiene una buena estructura global (Tabla 3.2).

Perfil del Poro

El perfil del poro a lo largo del eje z fue medido con el programa HOLE [234]. Tal como se puede observar en la Figura 3.3, existe una constricción de radio 1,5 Å delimitada por los residuos α_1 Pro240, β_2 Ala239 y γ_2 Pro239 pertenecientes a las hélices M2, a la altura del anillo -2 (Figura 1.6). Este radio no permite el paso de iones cloruro a través del canal, ya que el radio de Van de Waals de los aniones es de $\sim 1,75$ Å [235]. Por lo tanto, el modelo representa al receptor en un estado cerrado. En particular, los ángulos de las hélices M2, respecto del eje del canal, corresponden a un estado cerrado desensibilizado [2, 34, 46]. Este es el resultado esperado ya que el *template* empleado fue obtenido en dicho estado de activación.

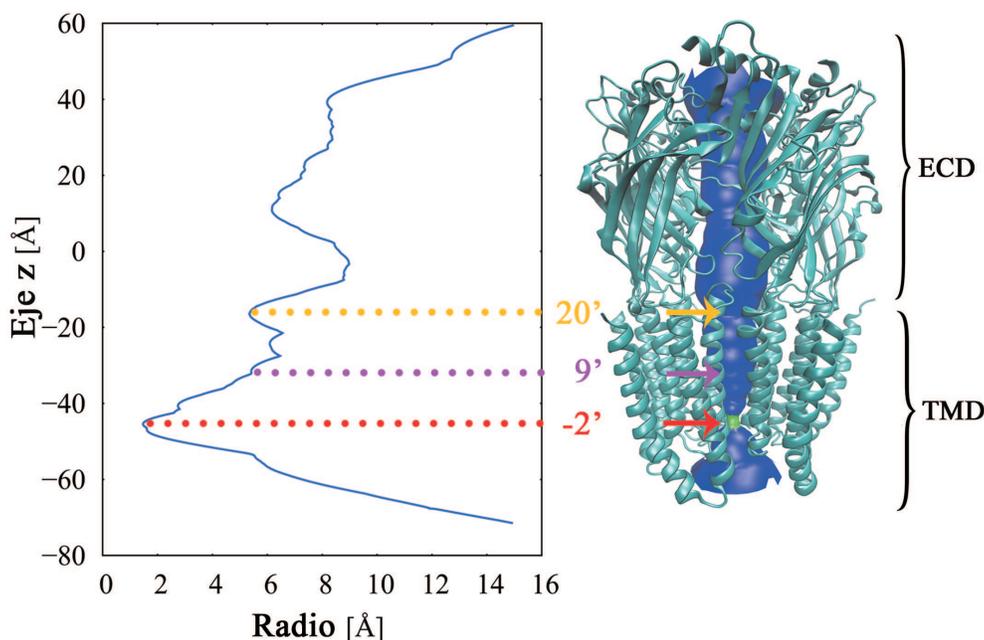


Figura 3.3: Perfil del canal. a. Radio del poro a lo largo del eje del canal; b. Visualización del poro como una superficie, el color azul representa radios mayores a 2Å, el verde representa valores inferiores. Se señalan los aminoácidos que forman los tres anillos relevantes para la apertura y el cierre del canal.

Interacción entre subunidades

En la bibliografía [236] se cuestiona el uso de la estructura PDB ID:4COF como plantilla para realizar modelos del receptor debido a que la interacción entre subunidades varía energéticamente para las distintas combinaciones. El homopentámero de subunidades β_3 es el subtipo que forma las interacciones más favorables y esto modificaría la forma y dispo-

sición de las cadenas laterales en los sitios de unión. Sin embargo, al momento de realizar el modelo todas las estructuras disponibles de la familia de los receptores Cys-Loop eran homopentaméricas.

Se llevó a cabo un análisis de la interacción entre subunidades mediante el servidor web PISA [237] para el receptor modelado (Tabla 3.3), para el receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ experimental PDB ID: 6D6U (Tabla 3.4) y para el homopentámero PDB ID: 4COF (Tabla 3.5). Se calculó el área correspondiente a la interfaz, los residuos de la interfaz, la energía libre de interacción entre las dos subunidades y su valor P (el cual representa que tan usual es dicha interfaz, valores menores a 0,5 corresponden a interfaces frecuentes), el número de puentes de hidrógeno y de puentes salinos. En ninguno de los tres casos se observaron puentes disulfuro entre subunidades.

Tabla 3.3: Propiedades de las interfaces en el modelo del receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$.

Interfaz	Nro. Residuos	Área [\AA^2]	ΔG [kcal/mol]	ΔG P-Value	Nro. PH	Nro. PS
A/B (α_1/β_2)	75/75	2509	-37,3	0,20	18	8
B/C (β_2/α_1)	73/68	2341	-27,3	0,51	19	1
C/D (α_1/β_2)	69/74	2503	-32,3	0,30	17	2
D/E (β_2/γ_2)	73/75	2347	-29,1	0,41	18	0
E/A (γ_2/α_1)	70/67	2360	-31,2	0,27	19	1

Tabla 3.4: Propiedades de las interfaces en el receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ obtenido experimentalmente.

Interfaz	Nro. Residuos	Área [\AA^2]	ΔG [kcal/mol]	ΔG P-Value	Nro. PH	Nro. PS
D/C (α_1/β_2)	77/79	2642	-43,8	0,08	15	6
C/B (β_2/α_1)	52/53	1678	-12,8	0,78	13	1
B/A (α_1/β_2)	62/63	1967	-22,4	0,48	13	3
A/E (β_2/γ_2)	71/70	2313	-29,6	0,36	15	0
E/D (γ_2/α_1)	60/61	1962	-24,2	0,28	9	2

Tabla 3.5: Propiedades de las interfaces en el receptor homopentámero β_3 de humano (PDB ID:4COF)

Interfaz	Nro. Residuos	Área [\AA^2]	ΔG [kcal/mol]	ΔG P-Value	Nro. PH	Nro. PS
A/B	75/74	2590	-36,3	0,28	22	8
B/C	65/69	2446	-33,6	0,32	22	5
C/D	71/71	2513	-31,9	0,38	27	5
D/E	69/71	2492	-31,8	0,37	22	4
E/A	70/67	2445	-30,3	0,42	18	5

Las interfaces entre subunidades del homopentámero son similares en cuanto a la energía libre de formación, el área expuesta, el valor P y la cantidad de puentes de hidrógeno y salinos. Por otro lado, en los dos receptores $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ las interfaces son claramente diferentes, reflejando su formación heterogénea. Para ambos sistemas la interfaz más favorable es la $\alpha_1+\beta_2-$, coincidente con el sitio de unión de GABA en la posición vecina al sitio de unión de las benzodiazepinas. Así mismo, en ambos receptores la interfaz menos favorable es la formada por las subunidades $\beta_2+\alpha_1-$.

Las diferencias entre las energías de formación de los dos receptores $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ no siguen ningún patrón específico que indique que la mayor energía de las interfaces del homopentámero se refleje en el modelo. De hecho, la interfaz $\alpha_1+\beta_2-$ resultó ser más favorable en ambos heteropentámeros, en comparación con la interfaz correspondiente en el receptor PDB ID: 4COF.

Empleo de modelos por homología en simulaciones de docking molecular

Ha sido fuente de debate la aptitud de los modelos obtenidos mediante modelado por homología para estudios posteriores tales como docking molecular, que requieren una descripción detallada de las posiciones y orientaciones de las cadenas laterales.

Cuando el docking no está guiado por datos experimentales se ha probado que la identidad de secuencia, en particular la identidad local, está altamente correlacionada con la calidad de los resultados obtenidos [172]. Por lo tanto, se calculó la identidad de secuencia para los seis loops que participan en la unión de ligandos en las dos cavidades estudiadas.

Tabla 3.6: Identidad de secuencia local entre la plantilla (PDB ID: 4COF) y las subunidades α_1 , β_2 y γ_2 .

Loop	α_1	β_2	γ_2
Loop A	60 %*	100 %**	60 %
Loop B	50 %*	100 %**	63 %
Loop C	33 %*	66 %**	25 %
Loop D	40 %**	80 %	40 %*
Loop E	46 %**	100 %	54 %*
Loop F	30 %**	77 %	22 %*

* Loops involucrados en la cavidad de unión de las Benzodiazepinas.

** Loops involucrados en la cavidad de unión ortostérica.

El loop F de la subunidad γ_2 , aunque no contiene huecos en su alineamiento, posee baja identidad de secuencia con el mismo loop de la subunidad β_3 . Los otros loops que participan en la unión presentan al menos un 30 % de identidad de secuencia con el *template* empleado, dando así mayor confianza a los resultados de docking. Estas diferencias en la estructura primaria son consistentes con una especificidad respecto de los compuestos que se unen a cada sitio de unión.

3.3.2. Modos Normales

Se ha propuesto que la transición entre estados de activación del receptor se manifiesta globalmente como el movimiento relativo de rotación entre los dominios extracelulares y transmembrana, actuando cada dominio como un cuerpo rígido que gira en sentidos opuestos [34]. Mediante el análisis de modos normales se observó este fenómeno en el modo de menor frecuencia (Figura 3.4).

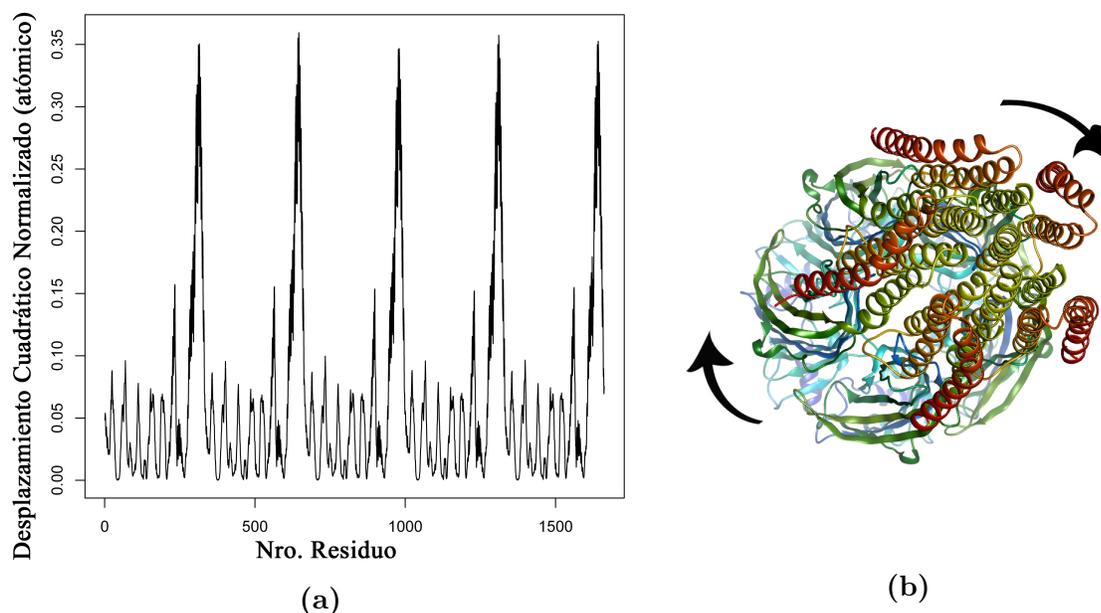


Figura 3.4: Modo normal de menor frecuencia. a. Desplazamiento cuadrático medio del $C\alpha$ para cada residuo. Son particularmente móviles los aminoácidos de la región transmembrana; b. Representación del movimiento.

Los modos siguientes, de mayor frecuencia, corresponden principalmente a movimientos relativos del ECD y TMD respecto del ángulo que forman con el eje perpendicular a la membrana (modos 8 y 9), y a movimientos del ECD en los cuales, a lo largo de dos direcciones, el receptor se alarga y aplasta alternadamente, similar a una respiración (modos 10 y 11). Los dos primeros reflejan una asimetría respecto al plano de la membrana, mientras que el segundo par de modos muestra un tipo de movimiento que refleja la falta de simetría absoluta, observada tanto experimentalmente como *in silico* a partir de simulaciones de grano grueso y el análisis de interfaces.

3.3.3. Simulaciones de dinámica molecular

Simulación Atomística

La simulación atomística del receptor modelado muestra que a lo largo de los primeros 100 ns éste conserva su estructura global, si bien se observan cambios a nivel local, especialmente en los sitios de unión en el ECD. El primer análisis fue el de la desviación cuadrática media (RMSD) de los átomos $C\alpha$ (Figura 3.5), que indica un movimiento del esqueleto de la proteína acorde a su tamaño y al protocolo de dinámica molecular. El RMSD alcanza un valor estable

cercano a 0,5 nm, del orden de magnitud esperable para este tipo de sistema.

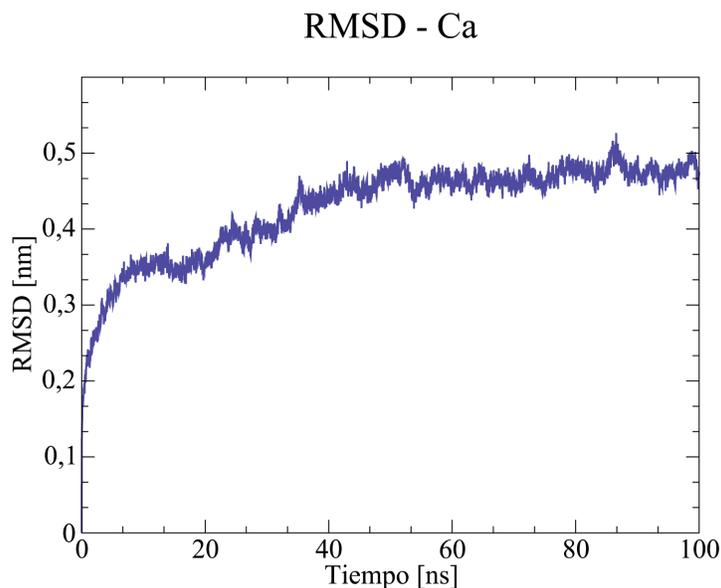


Figura 3.5: RMSD para la simulación del receptor en estado APO.

Un aspecto importante a tener en cuenta a lo largo de las simulaciones es el comportamiento de la membrana. El área por lípido resultó en promedio $0,61 \pm 0,01 \text{ nm}^2$, similar al valor experimental obtenido para membranas de POPC a la misma temperatura ($0,64 \pm 0,01 \text{ nm}^2$) [238]. El espesor de la membrana plasmática se calculó en $3,5 \pm 0,1 \text{ nm}$ en contraposición con el valor experimental $3,9 \pm 0,1 \text{ nm}$ [238].

Se pudo observar movimientos de apertura y cerrado del loop C y una gran movilidad del loop F, que es propuesto como muy móvil e importante para la acción de los fármacos [239,240] (Figura 3.6).

El radio a lo largo del canal varía durante la simulación de manera tal que la parte superior de la región transmembrana adquiere valores menores que la constricción inferior inicial, cuyo radio aumenta levemente (Figura 3.7). Esta transformación, podría deberse a un paso intermedio en el cierre del canal causado por la ausencia de agonistas. Las hélices M2, adoptan un ángulo menor respecto del eje del receptor, cerrando el canal en el extremo superior.

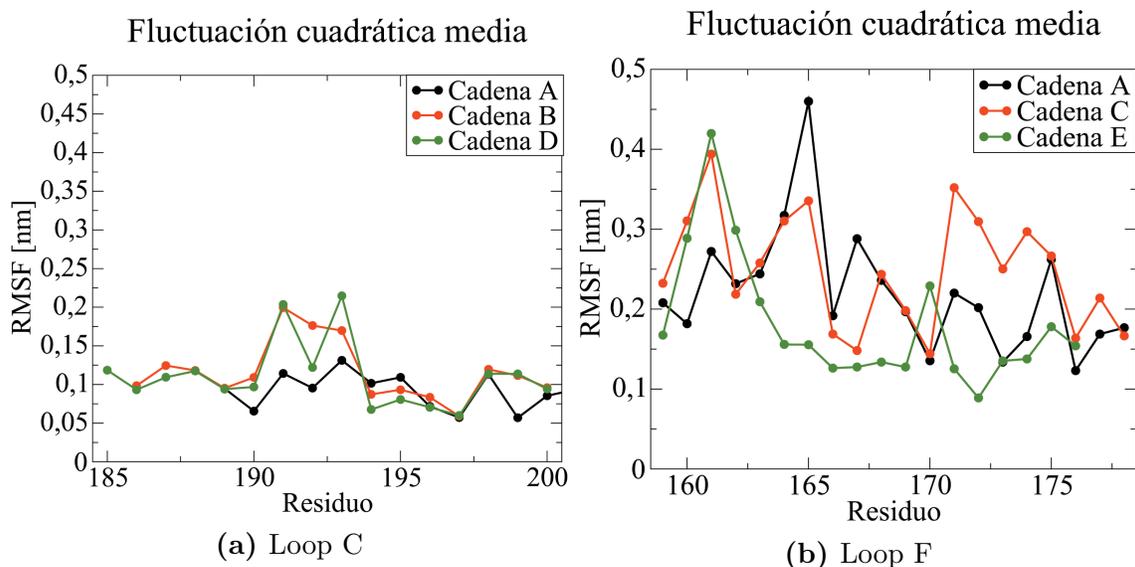


Figura 3.6: Fluctuación cuadrática media calculada para los loops C y F de las subunidades involucradas en las cavidades ortostéricas y de unión de gran afinidad de las benzodiazepinas.

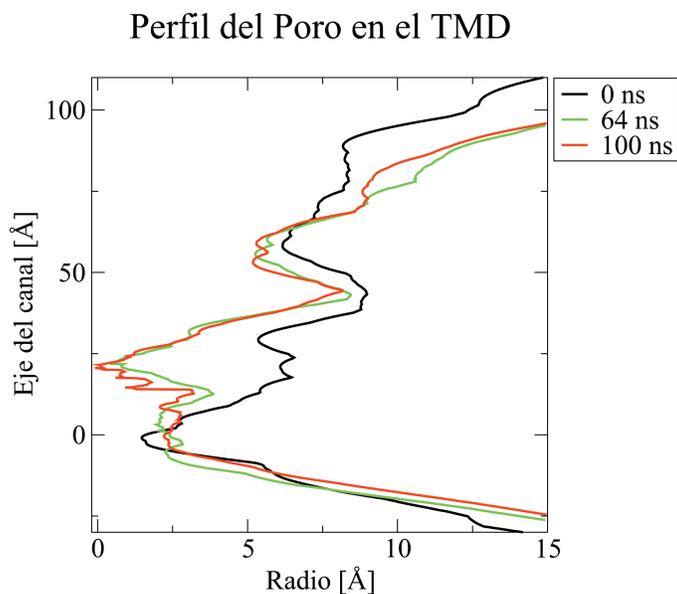


Figura 3.7: Radio del canal para las estructuras obtenidas de la dinámica molecular luego de 1 ns, 64 ns (estructura representativa de la *clusterización*) y de 100 ns.

Simulación de Grano Grueso

La simulación de grano grueso para el receptor modelado mostró que este experimenta cambios en la estructura global (Figura 3.8.a); más específicamente, se observó que las hélices M4 del dominio transmembrana se abren hacia la membrana. Esta modificación podría

deberse al efecto de simular con grano grueso sumado al hecho que en el receptor modelado falta el loop intracelular que conecta las hélices M3 y M4, que podría estabilizar una determinada orientación espacial de la hélice. Así mismo, el extremo C-terminal del receptor que debería ubicarse en la región extracelular, no se ha modelado completamente y por lo tanto facilita el movimiento de M4.

La simulación de grano grueso del receptor 4COF mostró un comportamiento similar al del receptor modelado. Los RMSD son del mismo orden de magnitud, siendo el del receptor experimental levemente superior (Figura 3.8.b). El RMSD de ambos receptores a lo largo de estas simulaciones son superiores a aquellos observados en las simulaciones atomísticas.

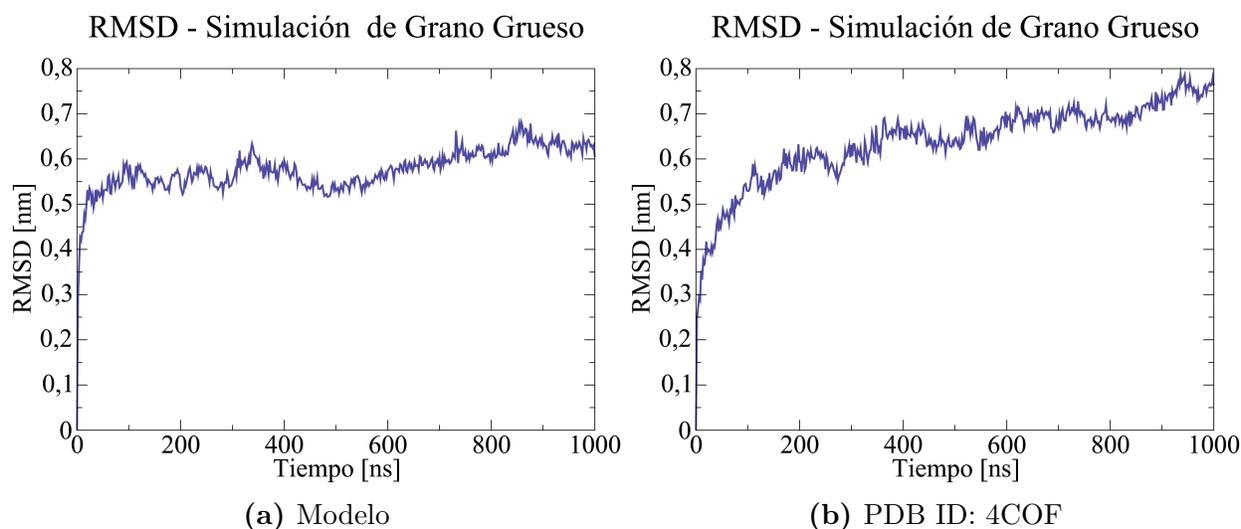


Figura 3.8: Desviación cuadrática media para el receptor representado con un campo de fuerza de grano grueso. Se calculó cada 20 pasos, empleando los *beads* que representan al esqueleto de la proteína.

La estructura secundaria del modelo (Figura 3.9.a) se mantuvo estable a lo largo de la simulación. En los primeros nanosegundos disminuyó del porcentaje de hélices alfa (H) y láminas beta (B), y se incrementó el tipo *coil* (C). La identificación de una estructura secundaria como *coil* puede corresponderse con regiones desestructuradas, o bien con otras estructuras no comprendidas en la clasificación anterior.

Inicialmente, los porcentajes correspondientes a cada una de las estructuras secundarias en la simulación del modelo fueron H= 37 %, B= 31 %, C= 32 %, y adquirieron los valores finales H= 35 %, B= 27 %, C= 38 %. La estructura secundaria del receptor cristalográfico posee un comportamiento similar (Figura 3.9.b). Los porcentajes correspondientes a cada estructura fueron H= 36 %, B= 31 % y C= 33 % inicialmente, y al finalizar la simulación

H= 33,5 %, B= 27,5 % y C= 39,0 %.

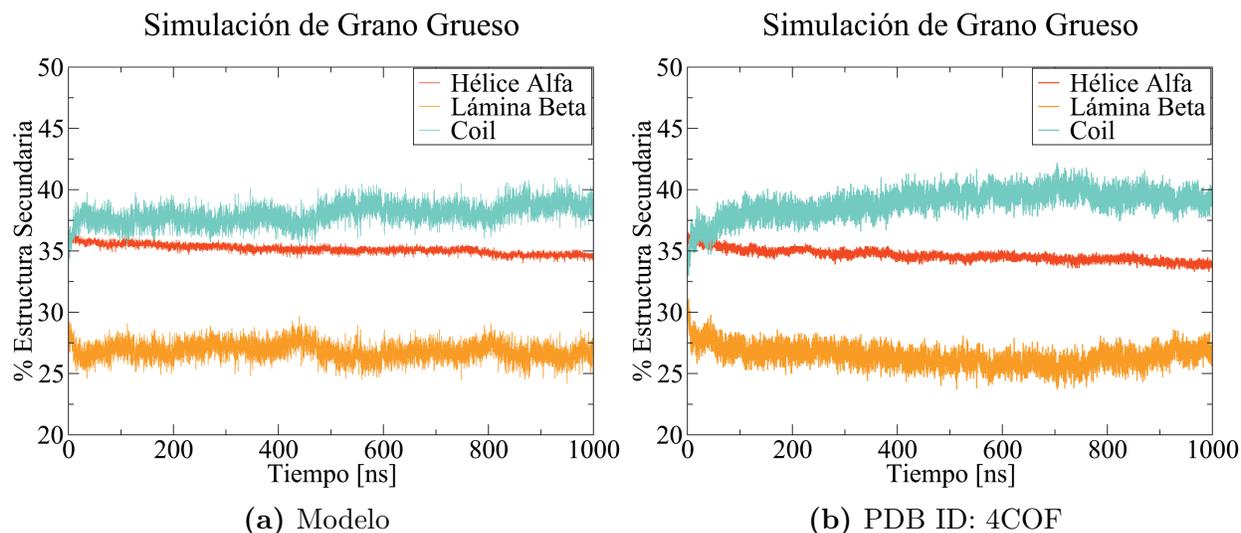


Figura 3.9: Evolución de la estructura secundaria a lo largo de las simulaciones de grano grueso. a. El modelo presenta en promedio H= $35,1 \pm 0,4$ %, B= $26,9 \pm 0,7$ %, C= $38,0 \pm 0,8$ %; b. El receptor cristalizado presenta en promedio H= $34,6 \pm 0,5$ %, B= $26,4 \pm 0,9$ %, C= 39 ± 1 %.

Tal como era esperado, no se observó el pasaje de cloruros a lo largo del canal en ninguno de los dos receptores. Ambos receptores se encuentran en un estado desensibilizado y sin ligandos, por lo tanto, en caso de cambiar de estado, pasarían al estado cerrado basal. Sí se observó la modificación de la orientación relativa de las hélices M2, que se cierran en el extremo superior. En la simulación del modelo se observó que los iones cloruro ubicados en la región extracelular del canal permanecen allí a lo largo de la trayectoria. En la simulación de la estructura cristalográfica (PDB ID: 4COF) uno de los iones llega a la región superior del dominio transmembrana, mostrando que esta ubicación es estadísticamente probable. El poro en la región transmembrana se mantiene deshidratado durante toda la simulación, con moléculas de agua llegando hasta el primer anillo de este dominio.

En cuanto a las propiedades de la membrana, en la simulación del modelo esta manifestó un espesor de $3,8 \pm 0,1$ nm (Figura 3.10.a), valor muy cercano al experimental $3,9 \pm 0,1$ nm [238]. El área por lípido se calculó en $0,70 \pm 0,01$ nm², levemente superior al valor experimental $0,64 \pm 0,01$ nm². En la simulación de PDB ID: 4COF los valores correspondientes al espesor de la membrana (Figura 3.10.b) y el área por lípido fueron $3,7 \pm 0,1$ nm y $0,71 \pm 0,02$ nm² respectivamente. El área por lípido nuevamente es mayor al valor experimental.

Se observó que en la región correspondiente a la membrana la densidad de agua e iones es

prácticamente nula (Figura 3.10). Además, la presencia de la proteína modifica la densidad del agua en la región donde está ubicada.

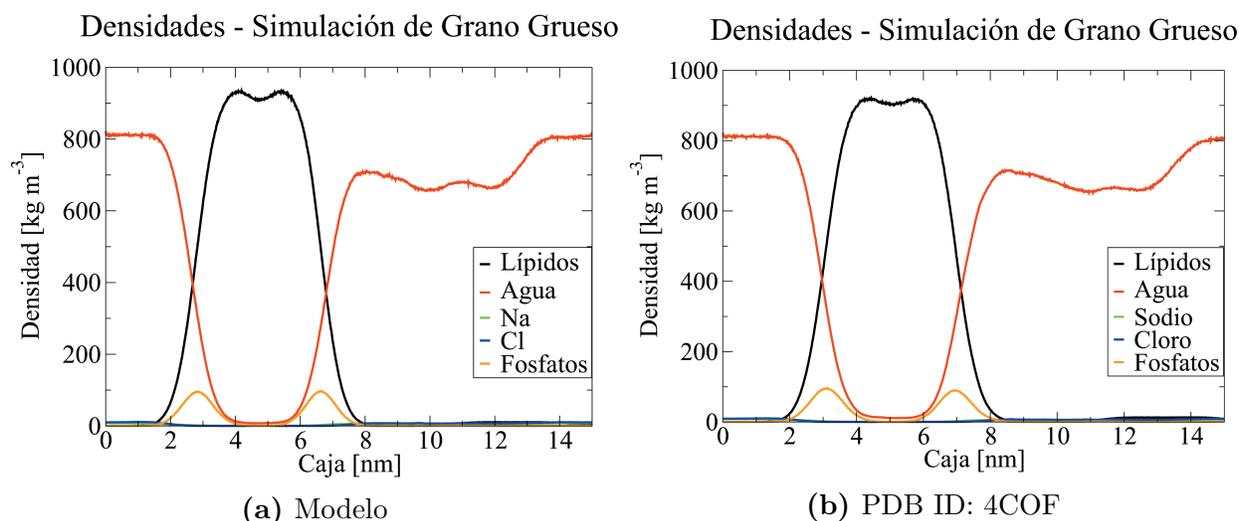


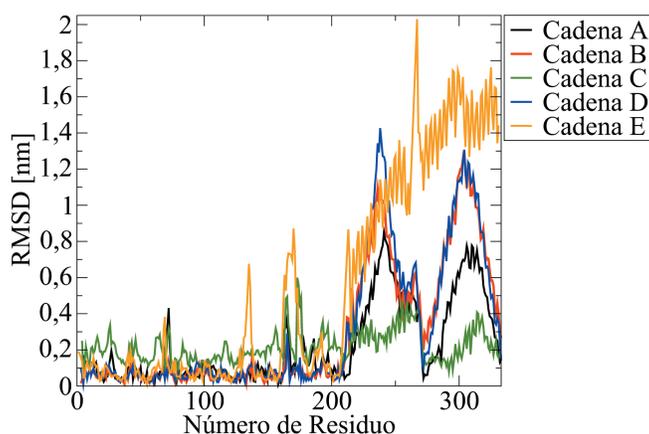
Figura 3.10: Densidades de las distintas especies que componen al sistema formado por el receptor membrana de POPC, agua e iones. a. Modelo; b. Receptor PDB ID: 4COF.

3.3.4. Comparación con el receptor PDB ID: 6D6U

Se realizó una comparación estructural del modelo del receptor con la estructura resuelta mediante criomicroscopía electrónica. Se calculó la desviación cuadrática media de los átomos $C\alpha$ de cada subunidad entre los dos receptores (Figura 3.11.a). Se observa que el ECD se encuentra conservado, mientras que el TMD (residuos 215-336) muestra diferencias muy marcadas, especialmente en las subunidades β_2 y γ_2 . La subunidad γ_2 muestra las variaciones más pronunciadas, con valores inusualmente altos de RMSD. Esta tendencia puede ser explicada por los distintos estados de activación de los receptores, junto con la falta de los loops pre-M1 y M2-M3 en la subunidad γ_2 de la estructura experimental, sumado a la pérdida de simetría del receptor PDB ID: 6D6U. Así mismo, Zhu, *et. al.* advirtieron en la publicación de la estructura, que la conformación del TMD está afectada por la presencia de detergentes y la falta del ICD [57].

La superposición del *backbone* del ECD del modelo *in silico* y de los receptores obtenidos experimentalmente PDB ID: 6D6U y 6D6T, mostró que no hay diferencias apreciables entre ellas (Figura 3.11.b).

Comparación Modelo por Homología y PDB ID: 6D6U



(a)



(b)

Figura 3.11: Comparación entre el modelo por homología y las estructuras experimentales del receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. a. RMSD por residuo calculado entre la estructura modelada y PDB ID: 6D6U; b. Superposición realizada con Chimera [199] de los ECD de la estructura modelada (beige) y las estructuras determinadas experimentalmente PDB ID: 6D6U (celestine) y 6D6T (lila).

3.4. Conclusiones

Luego de la evaluación del modelo mediante funciones energéticas provistas por el programa de modelado, y analizando parámetros estructurales diferentes tales como ángulos diedros y distancia entre enlaces, es posible asegurar que el modelo posee suficiente calidad estereoquímica.

Las energías de las interfaces son comparables con aquellas obtenidas para el receptor experimental PDB ID: 6D6U, y las interacciones están ligeramente alteradas respecto del homopentámero, como es esperado por ser una estructura heteromérica.

Los movimientos globales observados en las simulaciones, como el cierre del poro en la región superior y la pérdida de simetría, pueden ser identificados como una característica general del receptor y no como una peculiaridad del modelo. Por un lado, se observa el mismo tipo de comportamiento en las simulaciones del homopentámero; y por otro lado, se correlacionan con los primeros modos normales calculados. La pérdida de la simetría ha sido observada no solo en las simulaciones de grano grueso del modelo y del homopentámero, sino que además es característica en las estructuras resueltas experimentalmente, particularmente en aquellas que poseen la subunidad γ_2 . En ellas se observó una pérdida parcial de la pseudo-

simetría del canal debido a la presencia de dicha subunidad [57].

Todas las simulaciones muestran, mediante el RMSD, que la estructura del modelo es estable.

La comparación con la reciente estructura experimental del receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (PDB ID: 6D6U), muestra que el ECD no presenta grandes cambios respecto del modelo, mientras que el TMD es notablemente distinto. Debido a que no se pudo caracterizar el estado de activación de la estructura experimental y a la baja resolución de la misma, un modelo por homología como el presentado en este trabajo, ampliamente caracterizado, sigue siendo de utilidad para el estudio de los receptores GABA_A. Por otra parte, la contrastación entre el modelo y la estructura experimental sirvió para establecer la validez de los métodos computacionales empleados a lo largo de todo el trabajo.

Por los motivos expuestos anteriormente, la estructura del homopentámero es adecuada para modelar el receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. El modelo confeccionado durante este trabajo de tesis posee suficiente calidad como para ser empleado en estudios posteriores de docking y dinámica molecular para evaluar su interacción con moléculas de interés biológico como ligandos endógenos, compuestos farmacológicos y otras proteínas.

Capítulo 4

Parte II - Interacción con ligandos

4.1. Objetivos

- Corroborar la capacidad de los sitios de unión de contener ligandos conocidos.
- Encontrar los modos de unión de ligandos relevantes.
- Evaluar la estabilidad de los modos de unión.
- Calcular la energía libre de interacción de los complejos.

4.2. Métodos

Para llevar a cabo el análisis de interacción de distintos ligandos con el modelo del receptor GABA_A se emplearon tres técnicas distintas: Docking Molecular, simulaciones de Dinámica Molecular y el método de Adapting Biasing Force (ABF).

Por un lado se estudió la unión de los ligandos GABA, muscimol, bicuculina y gabazine (Figura 1.9) a los sitios de unión ortostéricos. Por otro, se analizaron los modos de unión de diazepam, flurazepam, clonazepam, flunitrazepam, flumazenil, Ro15-4513, zolpidem y eszopiclona (Figura 1.11) a la cavidad de las benzodiazepinas.

4.2.1. Docking Molecular

AutoDock Vina

Se empleó AutoDock Vina para obtener posibles modos de unión de ligandos mencionados anteriormente. En cada caso se aplicó una grilla de $24 \times 24 \times 24 \text{ \AA}^3$ centrada en el sitio de unión correspondiente. Se emplearon cargas Gasteiger para el receptor y para los ligandos. Se calcularon 50 modos de unión, con el nivel 50 de exhaustividad en la búsqueda (superior al valor por defecto) y se estableció como criterio de corte un máximo de diferencia de energía entre el mejor modo y el peor de 3 kcal/mol (valor por defecto).

HADDOCK

Paralelamente se utilizó el programa HADDOCK [137, 170], que incorpora información experimental sobre la interacción para predecir los modos de unión. Estos datos fueron obtenidos a partir de una exhaustiva búsqueda bibliográfica que dió como resultado las tablas A.1, A.2, A.3 y A.4 del Apéndice A. La información experimental se incorporó a la simulación determinando una serie de residuos activos y pasivos en el receptor (el ligando se considera como un único residuo activo). En todos los casos se definieron como activos aquellos aminoácidos para los cuales había evidencia clara de interacción con el ligando y los residuos pasivos fueron definidos por el programa como aquellos circundantes a los activos.

El docking se realizó a través de la interfaz Gurú del servidor de HADDOCK, manteniendo la mayor parte de las opciones por defecto, excepto el límite para la formación de grupos, que se estableció en 2 \AA y se impidió que se eliminen los hidrógenos no polares (siguiendo las recomendaciones del manual de usuario). La parametrización del ligando fue realizada automáticamente por PRODRG [210] y el estado de protonación de las Histidinas fue obtenido mediante el servidor MolProbity [201].

Para cada ligando se obtuvieron como máximo 200 modelos, previamente refinados mediante simulaciones cortas de DM con solvente explícito. En este paso se permitió el movimiento libre de las cadenas laterales de los aminoácidos.

Análisis

Los mejores modos de unión, clasificados mediante ambos programas de Docking Molecular, fueron sometidos a un análisis de las interacciones entre los ligandos y los residuos del receptor. Para dicho análisis se establecieron ciertas definiciones: los átomos vecinos son aquellos separados por una distancia menor que la suma de su radio de Van der Waals más 2,75 Å (diámetro aproximado de una molécula de agua). Después de identificar todos aquellos residuos que poseían átomos a una distancia de contacto, se identificaron las interacciones genuinas, es decir aquellas que efectivamente ocurren en la naturaleza: puentes de hidrógeno, puentes salinos, interacciones hidrofóbicas, interacciones cation- π y π -stacking.

Estas interacciones fueron tabuladas y comparadas con las observadas experimentalmente (Ver Apéndice A). Luego se clasificaron los residuos interactuantes en Verdaderos Positivos (VP), Falsos Positivos (FP) y Falsos Negativos (FN). Los VP son aquellos aminoácidos en los cuales coincide la interacción predicha por nuestro modelo y la propuesta experimentalmente. Existen dos clases de FP: aquellos residuos identificados en nuestro modelo como interactuantes con el ligando pero que contradice la información experimental, y aquellos ubicados a una distancia de contacto pero cuya interacción no es genuina. Finalmente, los FN son aminoácidos propuestos en la literatura como interactuantes, pero que no lo hacen en nuestro modelo.

Una vez clasificados los aminoácidos se computaron dos índices estadísticos: *precisión* y *sensibilidad*, que han sido empleados en trabajos para evaluar la calidad de modos de unión obtenidos computacionalmente [241–245].

$$Precisión = \frac{VP}{VP + FP} \quad (4.1)$$

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} \quad (4.2)$$

Para la evaluación de las poses encontradas se tuvo en cuenta la correlación existente entre la similitud estructural de ligandos, sus modos de unión y sus funciones [246, 247]. El índice de Tanimoto es considerado una de las mejores métricas para el cálculo de similitud (Ec. 4.3):

$$T_C(A, B) = \frac{c}{a + b - c} \quad (4.3)$$

donde c es el número de características que comparten los compuestos A y B, y a y b corresponden al número de características presentes en cada compuesto [247]. Para evaluar los índices de Tanimoto entre cada ligando se empleó el programa OpenBabelGUI V.2.4.1 [248, 249].

4.2.2. Dinámica molecular

Los protocolos de docking son de naturaleza estática y, en general, no consideran explícitamente al solvente, o lo hacen en simulaciones muy breves. Por este motivo, las simulaciones de dinámica molecular permitieron que tanto los ligandos como las cadenas laterales de los receptores se adaptaran a la nueva conformación del complejo. Se ha demostrado recientemente, en estudios de interacción proteína-ligando de GPCRs basados en modelos por homología (con baja identidad de secuencia), que las simulaciones de dinámica molecular mejoran la calidad de las poses en relación a los datos experimentales [243, 250, 251].

Se simuló, mediante DM, secuencialmente al receptor con distintos ligandos unidos a sus correspondientes sitios de unión. Los sistemas elegidos fueron:

- Receptor con un GABA unido al sitio G².
- Receptor con un Muscimol unido al sitio G².
- Receptor con un Gabazine unido al sitio G².
- Receptor con un Bicuculina unido al sitio G¹.
- Receptor con dos GABA y un Diazepam.
- Receptor unido a Diazepam.
- Receptor unido a Flurazepam.
- Receptor unido a Clonazepam.
- Receptor unido a Flunitrazepam.

- Receptor unido a Flumazenil.
- Receptor unido a Ro15-4513.
- Receptor unido a Zolpidem.
- Receptor unido a Eszopiclona.

En todos los casos se simularon los complejos con mejores índices de *precisión y sensibilidad*. Adicionalmente, algunos complejos (GABA, diazepam, Ro15-4513 y flumazenil) fueron simulados con conformaciones iniciales alternativas a modo de comparación.

Tanto el protocolo como las condiciones de simulación fueron las mismas que aquellas empleadas para simular al receptor en estado APO (Ver sección 3.2.3 en página 72). Los parámetros que describen las propiedades de los ligandos fueron obtenidos a partir del repositorio *Automated Topology Builder repository* (ATB) [252].

Todas las simulaciones fueron filtradas con *g-filter* y *clusterizadas* con *g-cluster* para obtener las estructuras representativas de la simulación. Así mismo, las propiedades macroscópicas del sistema fueron monitoreadas mediante el uso de *g-energy*.

4.2.3. ABF

El método de *Adaptive Biasing Force*, o ABF, fue implementado a través del programa NAMD2.12 [142, 253, 254] que posee un módulo específicamente diseñado para estos cálculos (Módulo de Variables Colectivas) [255]. Debido al alto costo computacional que implican estas simulaciones se trabajó solamente con los ECDs de las subunidades α_1 y γ_2 .

Las interacciones atómicas de la proteína fueron descritas a través del campo de fuerza AMBER99SB. Es un campo de fuerza del tipo *All atom* y representa detalladamente las interacciones con el ligando, lo cual es requerido para este tipo de análisis. El ligando fue parametrizado con el software ACPYPE [209, 211] empleando el campo de fuerzas GAFF (del inglés Generalized Amber Force Field) [256]. Se empleó el modelo de agua TIP3P [257], que al igual que el SPC es un modelo de tres puntos, y además es compatible con campos de fuerza AMBER.

El protocolo a seguir fue distinto respecto de aquel empleado para realizar las simulaciones

de dinámica molecular, ya que el objetivo y los requerimientos son diferentes. En primera instancia se realizó una minimización de energía de 10.000 pasos empleando el algoritmo de Gradiente Conjugado. Luego se realizó un equilibrado de 5 ns en el ensamble NPT. En todos los casos se aplicaron restricciones al movimiento de los átomos del esqueleto de la proteína con fuerza armónica de constante 2 kcal/mol.Å^2 . Las fuerzas de restricción son ortogonales a la dirección en la cual se calculó el gradiente de la energía libre, tal que la medición fue efectivamente realizada en grados de libertad sin restricciones. La temperatura se mantuvo constante en 310 K mediante el termostato de Langevin empleando un coeficiente de amortiguamiento de 1 ps^{-1} ; la presión se mantuvo en 1 atm mediante el empleo del barostato de Langevin con el período del pistón de 200 fs y constante de decaimiento 100 fs. Los termostatos y barostatos empleados, así como los parámetros que los acompañan son los recomendados para este tipo de simulaciones. Se eligió un tiempo de integración de 2 fs, y para ello todos los enlaces fueron restringidos mediante el algoritmo SHAKEH. Las interacciones electrostáticas fueron tratadas con el algoritmo Particle Mesh Ewald (PME) tomando una grilla con un espaciado de 1 Å . Las interacciones de Van der Waals se truncaron con un valor de corte de 1 nm.

Se eligió como variable colectiva la distancia D entre los centros de masa del dominio ECD de la proteína, y los ligandos (Figura 4.1) para representar la salida de los mismos. En todos los casos se tomaron intervalos de $0,1 \text{ Å}$ y 1000 muestras por cada intervalo previas a la aplicación de la fuerza. Además se empleó un potencial de 10 kcal/mol para delimitar los extremos inferior y superior de cada ventana.

Se recomienda que las simulaciones realizadas empleando este método se estratifiquen, es decir, que se dividan en pequeñas ventanas para alcanzar la convergencia en un tiempo menor. Debido a que las estructuras que se emplearon para cada paso de la estratificación debieron estar equilibradas, se realizó una simulación de ABF previa para toda la trayectoria. En cada sistema la simulación inicial, de 5 ns, se realizó variando la distancia D entre 8 Å y 40 Å (Fig.4.1). De dicha simulación se adquirieron estructuras cada 2 Å y se simularon en forma secuencial hasta obtener la convergencia energética luego de 20 ns. En ciertos casos, en los que el muestreo de las regiones más cercanas al mínimo no fueron suficientes, se emplearon ventanas de 1 Å .

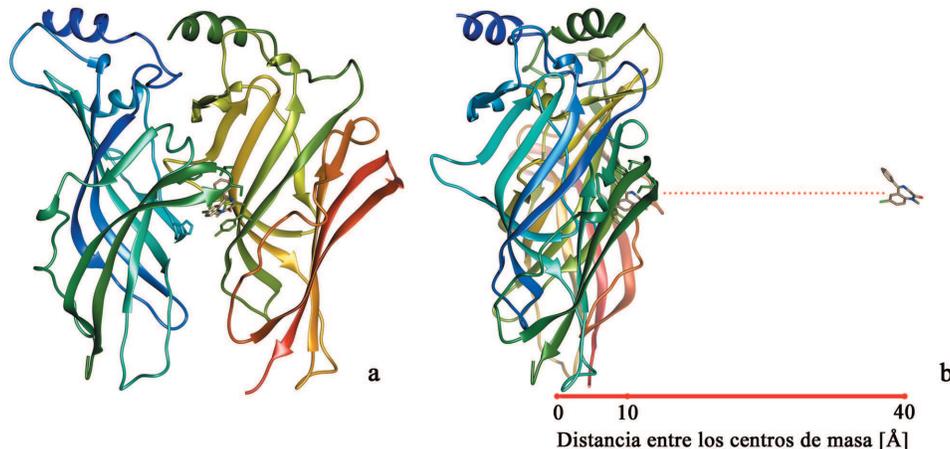


Figura 4.1: ABF. a. Vista frontal de la configuración inicial; b. Vista lateral esquemática de la variación de la distancia a lo largo de la coordenada de reacción. En la simulación el ligando puede moverse en un casquete esférico de radio D y espesor 2 \AA .

La convergencia está definida por la desviación cuadrática media de la energía (RMSE, Ec.4.4), que se consideró realizada si es del orden de 2 kcal/mol .

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i,j}^N (x_i - x_j)^2}{N}} \quad (4.4)$$

Debido a los tiempos de cálculo se realizaron simulaciones de ABF sólo para diazepam, zolpidem y flumazenil. Se eligieron estos ligandos ya que poseen valores de energía libre de unión experimentales publicados.

4.3. Resultados

4.3.1. Sitio de unión ortostérico

Se analizaron las interacciones presentes para cada uno de los modos de unión obtenidos y se contrastaron con los datos experimentales (Tablas A.1 y A.2). Con esta información se calcularon los índices de *precisión* y *sensibilidad*, y se seleccionaron las poses más representativas. Se analizó la unión de ligandos en los dos sitios ortostéricos y se obtuvieron, en general, configuraciones similares, así como también puntajes del mismo orden de magnitud.

En general, todos los estudios mostraron índices de *precisión* y *sensibilidad* altos (Tabla 4.1), indicando que hay pocos residuos en el sitio de unión que no son reconocidos por los

protocolos de docking o no están disponibles para la interacción en los modelos aquí propuestos. Sin embargo, la bicuculina representa una excepción ya que posee mejor índice de *sensibilidad* que de *precisión*. Una posible causa de este fenómeno es el tamaño del ligando, ya que ocupa una gran fracción del sitio de unión.

Tabla 4.1: Índices de *precisión* y *sensibilidad* de los modos de unión obtenidos mediante simulaciones de docking molecular y dinámica molecular de ligandos de la cavidad Ortostérica.

Ligando	Software	Precisión	Sensibilidad
GABA	ADV	1,00	0,81
	HADDOCK	1,00	0,81
	DM	1,00	0,78
Muscimol	ADV	0,85	0,79
	HADDOCK	1,00	0,75
	DM	1,00	1,00
Bicuculina	ADV	0,73	0,85
	HADDOCK	-	-
	DM	0,50	0,08
Gabazine	ADV	0,93	0,72
	HADDOCK	1,00	0,76
	DM	0,89	0,44

Como característica general, los índices de *precisión* y *sensibilidad* revelan que las poses de los agonistas de la cavidad ortostérica fueron mejoradas o se mantuvieron igual a lo largo de las simulaciones de DM. Los antagonistas, por su parte presentan una disminución marcada de ambos índices.

Mientras que las poses de GABA y muscimol no presentan falsos positivos (Tabla 4.2), los antagonistas no logran acomodarse en el sitio de unión y las cadenas laterales circundantes no logran re-organizarse alrededor de los ligandos. En cuanto a los Falsos Negativos de GABA, β_2 Ser156 forma un puente de hidrógeno con el ligando por un corto período de tiempo y no puede considerarse un VP. Sin embargo, simulaciones más largas podrían mejorar estadísticamente el contacto. β_2 R207 interactúa con un residuo del loop F (Figura 4.6) y

con β_2 Glu155 (Figura 4.7), por lo tanto, si bien no está interactuando directamente con el ligando, tiene una participación activa en el modo de unión.

Tabla 4.2: Residuos de la cavidad Ortostérica clasificados de acuerdo a su interacción con los ligandos para los complejos obtenidos de las simulaciones de DM.

Ligando	Verdaderos Positivos	Falsos Positivos	Falsos Negativos
GABA	β_2 Tyr97, β_2 Glu155, β_2 Tyr157, β_2 Gly158, β_2 Phe200, β_2 Ser201, β_2 Thr202, β_2 Tyr205, α_1 Phe65, α_1 Thr130	-	β_2 Ser156, β_2 R207, α_1 Arg67
Muscimol	β_2 Tyr97, β_2 Glu155, β_2 Ser156, β_2 Tyr157, β_2 Phe200, β_2 Thr202, β_2 Tyr205, β_2 Arg207 α_1 Phe65, α_1 Arg67, α_1 Arg120, α_1 Thr130	-	-
Bicuculina	α_1 Val181	α_1 Arg173	β_2 Tyr97, β_2 Leu99, β_2 Tyr157, β_2 Phe200, β_2 Thr202, β_2 Tyr205, β_2 Arg207 α_1 Phe65, α_1 Arg67, α_1 Leu118, β_2 Ser156, α_1 Arg132
Gabazine	β_2 Phe200, β_2 Tyr205, α_1 Phe65, α_1 Arg67, α_1 Ser69 α_1 Leu118, α_1 Arg120, α_1 Thr130	α_1 Arg173	β_2 Tyr97, β_2 Leu99, β_2 Ser156, β_2 Tyr157, β_2 Gly158, β_2 Ser201, β_2 Thr202, β_2 Gly203, α_1 Asp63, α_1 Val181

Para evaluar la estabilidad de las uniones se calculó la desviación cuadrática media (RMSD) de los átomos de cada uno de los ligandos y de los átomos del esqueleto del receptor a lo largo de las simulaciones (Figura 4.2). Los agonistas son estables en el sitio de unión mientras que los antagonistas son muy móviles. El RMSD del receptor es similar en los cuatro complejos entre si, y respecto de la estructura APO.

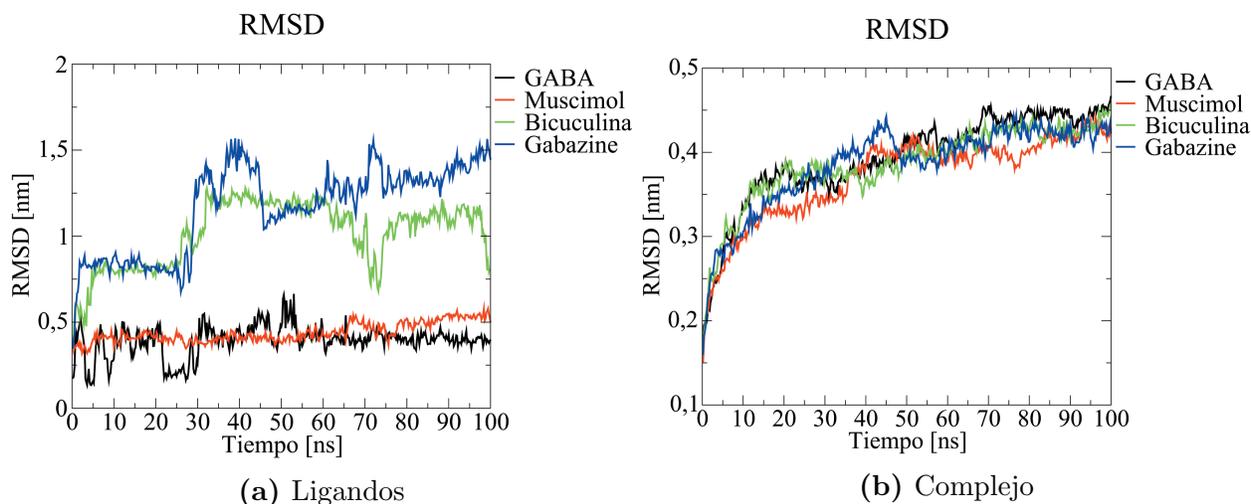


Figura 4.2: a. Desviación cuadrática media de los átomos de los ligandos que se unen al sitio de unión ortostérico a lo largo de las simulaciones de DM. El ajuste previo al cálculo se realizó sobre los átomos del esqueleto de la proteína; b. Desviación cuadrática media de los C_{α} del receptor a lo largo de las simulaciones de DM con ligandos unidos a la cavidad ortostérica.

GABA

El docking con HADDOCK dió como resultado, en ambos sitios, dos *clusters* los cuales contenían el 95 % de todos los modelos refinados, siendo el más numeroso el *cluster* de menor puntaje, que es el que contiene los complejos más favorables. En la mejor configuración el ácido carboxílico de GABA forma un puente salino con α_1 Arg67 y un puente de hidrógeno con β_2 Thr202. Uno de los carbonos laterales está en contacto con β_2 Tyr205 y β_2 Tyr97. Además, este último residuo interactúa con la amina protonada, la cual está en contacto con β_2 Glu155 y β_2 Ser156. α_1 Phe65 es parte de la base de la cavidad, muy cercana al ligando ($< 4 \text{ \AA}$) y forma parte de la denominada *caja aromática* compuesta por β_2 Phe200, β_2 Tyr157, β_2 Tyr97 y β_2 Tyr205. Todas estas características están de acuerdo con lo observado experimentalmente.

Los resultados de ADV fueron similares para los dos sitios de unión, en los cuales se pueden observar las interacciones anteriormente nombradas. La afinidad calculada en los dos sitios de unión es la misma ($-5,0 \text{ kcal/mol}$).

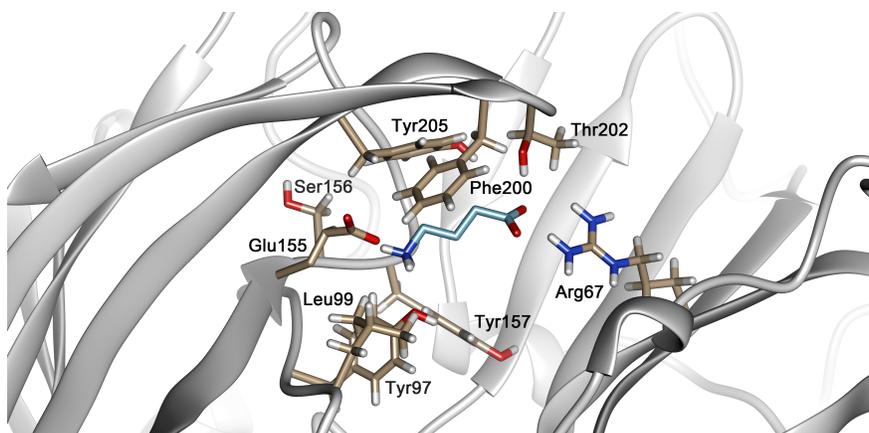


Figura 4.3: Modo de unión del ligando GABA obtenido mediante el programa HADDOCK.

La simulación del receptor con una molécula de GABA unida al sitio G^2 de la estructura obtenida por HADDOCK mostró que el ligando permanece unido al sitio de unión los 100 ns. Sin embargo, perdió el contacto de α_1 Arg67 que se supone vital para la unión. A lo largo de esta simulación mantiene los puentes de hidrógeno con β_2 Glu155 y con los residuos del loop C β_2 Ser201 y β_2 Thr202.

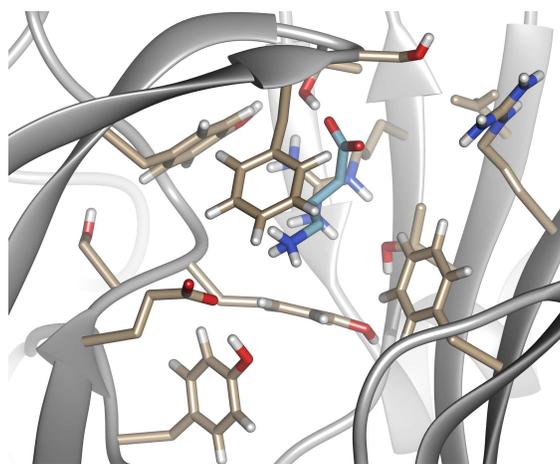


Figura 4.4: Pose de GABA en la estructura representativa de la dinámica molecular realizada con el ligando en el sitio G^2 .

En forma independiente, se simuló al receptor unido a dos moléculas de GABA y una de diazepam. La conformación inicial del sistema fue obtenida a partir de HADDOCK. En esta simulación, diazepam permaneció en su sitio de unión (Ver sección 4.3.2) al igual que la molécula de GABA en G^1 . Sin embargo, la otra molécula de GABA sale de la cavidad G^2 a los 15 ns. A lo largo de la simulación GABA en G^1 interactúa mediante puentes de

hidrógeno con α_1 Arg67, α_1 Thr130, β_2 Tyr97, β_2 Glu155, β_2 Ser156, y con los residuos del loop C β_2 Ser201, β_2 Thr202 y β_2 Tyr205.

En general, los resultados obtenidos para este ligando luego de la DM no mejoran los obtenidos en el docking. Estos resultados, más allá de las interacciones específicas que posean inicialmente, nos indican que el entorno del ligando contribuye a que este se mantenga en determinada conformación y en el sitio de unión.

La publicación de las estructuras PDB ID: 6D6U y 6D6T, en las cuales el receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ se encuentra unido a dos moléculas de GABA, permitió la comparación de los modos de unión obtenidos *in silico* con información estructural experimental. Al comparar las poses de GABA en ambas cavidades se observó que, si bien las cadenas laterales se superponen casi completamente, GABA posee un pequeño cambio en su orientación (RMSD 0,8Å) que modifica ciertos contactos. Esto indica que el ligando no se une de una única forma a las distintas cavidades. En ambos casos GABA mantiene interacciones hidrofóbicas con α_1 Phe65, β_2 Tyr157 y β_2 Tyr205 (al igual que en el modo de unión predicho *in silico*) y un puente salino con α_1 Arg67. Sin embargo, en uno de los dos casos mantiene un puente de hidrógeno con β_2 Thr130 (al fondo de la cavidad) y en el otro con β_2 Tyr97.

La comparación entre los modos de unión de GABA en la cavidad G² para la pose encontrada con AutodockVina, HADDOCK y la estructura 6DGU mostró que el modo de unión provisto por HADDOCK se asemeja más al experimental (Figura 4.5). RMSD = 1,3 Å vs RMSD = 3,3 Å. Así mismo, el rotámero de la α_1 Arg67 presenta diferencias, entre el complejo experimental y el complejo de HADDOCK. Esta diferencia en la disposición de la cadena lateral podría causar el desacople posterior entre la arginina y el ligando.

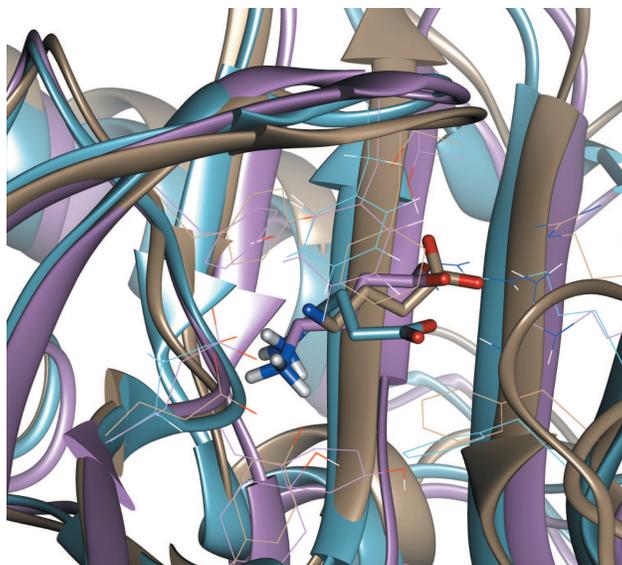


Figura 4.5: Comparación de los modos de unión de GABA según ADV (celeste), HADDOCK (lila) y la estructura experimental PDB ID: 6D6U (beige).

Es interesante destacar el comportamiento, a lo largo de las simulaciones de DM, de ciertos residuos del sitio de unión. Si GABA permanece en su sitio de unión, el loop F se acerca a la subunidad principal. Dicho acercamiento se puede observar en la Figura 4.7, que compara la distancia entre los aminoácidos β_2 Arg207 y α_1 Asp184, pertenecientes a los loop C y F respectivamente, en presencia y ausencia de GABA. Estos aminoácidos se encuentran a una distancia semejante en la estructura PDB ID: 6D6U ($\sim 7,7$ Å), lo que refuerza la evidencia a favor del acercamiento del loop F.

Distancia entre Asp184 y Arg207

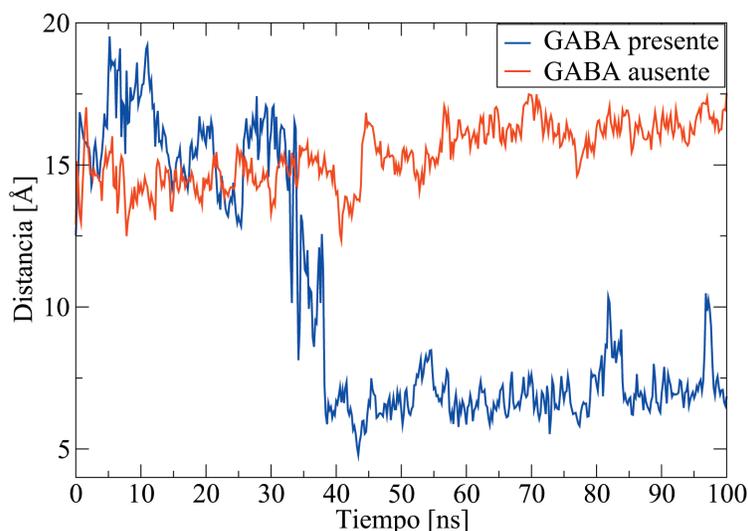


Figura 4.6: Distancia entre β_2 Arg207 y α_1 Asp184 para los dos sitios de unión ortostéricos a lo largo de la simulación de DM. Cuando el ligando se encuentra en el sitio de unión (celestes) se produce un acercamiento del loop F hacia la cara principal del sitio.

La red de interacciones entre β_2 Arg207, β_2 Glu153 y β_2 Glu155 parece independiente de la presencia de GABA (Figura 4.7). En la estructura experimental se observan también puentes de hidrógeno entre estos residuos.

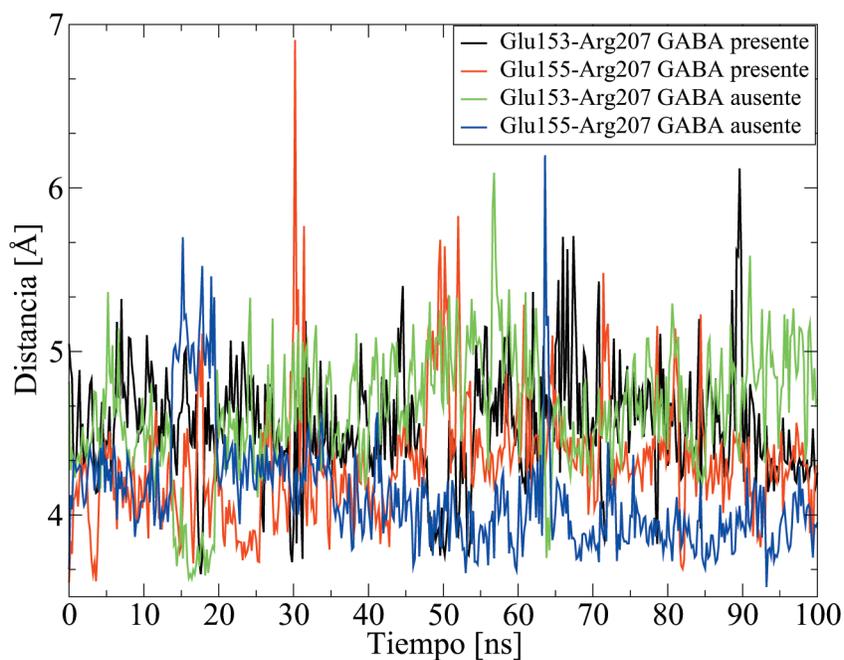


Figura 4.7: La cercanía entre los grupos cargados de los residuos β_2 Arg207, β_2 Glu153 y β_2 Glu155 es un indicador de una posible interacción del tipo puente salino.

Muscimol

Mediante HADDOCK se encontró un único modo de unión para muscimol, representando el 98,5 % de las estructuras refinadas. En este caso, la configuración revela dos puentes de hidrógeno: entre el grupo cetona y α_1 Arg67, y entre la amina protonada y el esqueleto de β_2 Ser156. Dos puentes salinos se forman entre la amina protonada y los aminoácidos β_2 Glu155 y β_2 Tyr97. Es factible también que se establezca una interacción cation- π con β_2 Tyr97 y π -stacking con β_2 Phe200 (Figura 4.8).

El modelo de unión obtenido mediante ADV, muestra puentes salinos con α_1 Arg67, β_2 Glu155 y β_2 Tyr97; interacciones hidrofóbicas con α_1 Phe65 y π -stacking con β_2 Phe200. Existe evidencia experimental de que estos residuos interactúan con el ligando (Tablas A.1 y A.2). Las configuraciones de los modelos anteriores [1, 56] coinciden en la ubicación entre los residuos α_1 Arg67 y β_2 Glu155, aunque no se ajustan completamente a la posición propuesta aquí.

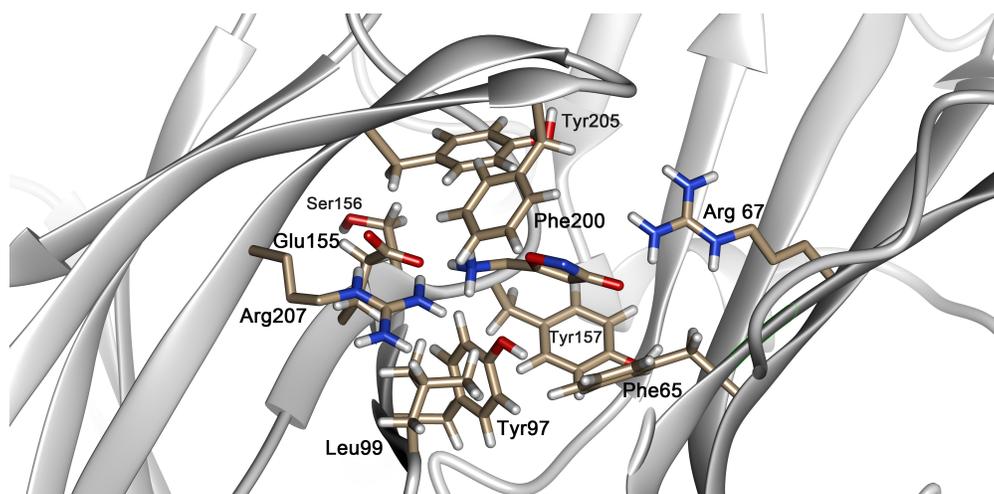


Figura 4.8: Estructura del complejo receptor GABA_A-muscimol obtenida con HADDOCK.

Finalmente, la dinámica molecular realizada a partir de la estructura obtenida con HADDOCK, mostró interacciones del tipo puentes de hidrógeno con α_1 Arg120, α_1 Thr130, β_2 Glu155 y β_2 Thr202 (ocupancias de 1 %, 61 %, 0,4 % y 53 %, respectivamente), además π -stacking con α_1 Phe65 y β_2 Tyr205. Así mismo, a lo largo de la simulación muscimol estableció interacciones del tipo puente salino con α_1 Arg67 (ocupancia 1 %) y puente de hidrógeno con β_2 Tyr97, β_2 Ser156 y β_2 Ser201 (ocupancias de 13 %, 3 % y 24 %, respectivamente). Tam-

bién se observaron interacciones hidrofóbicas con β_2 Phe200.

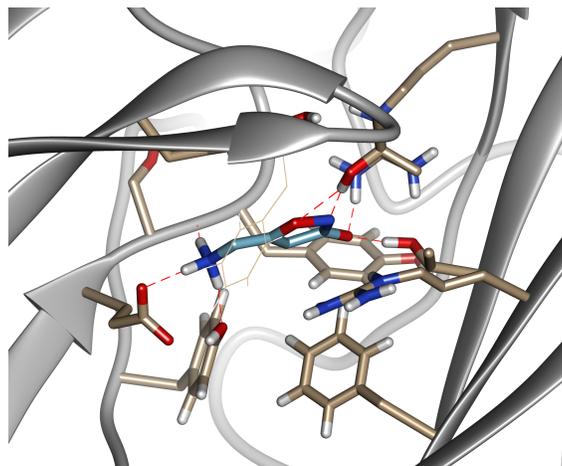


Figura 4.9: Estructura representativa de la unión del ligando muscimol durante la dinámica molecular. La estructura se obtuvo de la clusterización de la simulación de producción.

Bicuculina

Establecer los posibles modos de unión del ligando bicuculina resultó dificultoso por dos razones: la escasa información experimental sobre las interacciones que establece con el receptor y debido a que no fue posible realizar el docking de bicuculina mediante HADDOCK.

En el modelo de unión obtenido mediante ADV, el residuo α_1 Phe65, hipotéticamente importante, se ubicó paralelo al anillo benzénico de bicuculline en un plano 3,6 Å por debajo del ligando interactuando, posiblemente, mediante π -stacking tal como se ha predicho experimentalmente. El ligando interactúa con los residuos β_2 Tyr97, β_2 Leu99, β_2 Tyr157, β_2 Phe200, β_2 Thr202, β_2 Tyr205, β_2 Arg207, α_1 Arg67, α_1 Leu118 y α_1 Val181. Sander y colaboradores [56], mostraron una posición que no está en concordancia con nuestros resultados, pero no presentaron información experimental que valide dicha hipótesis.

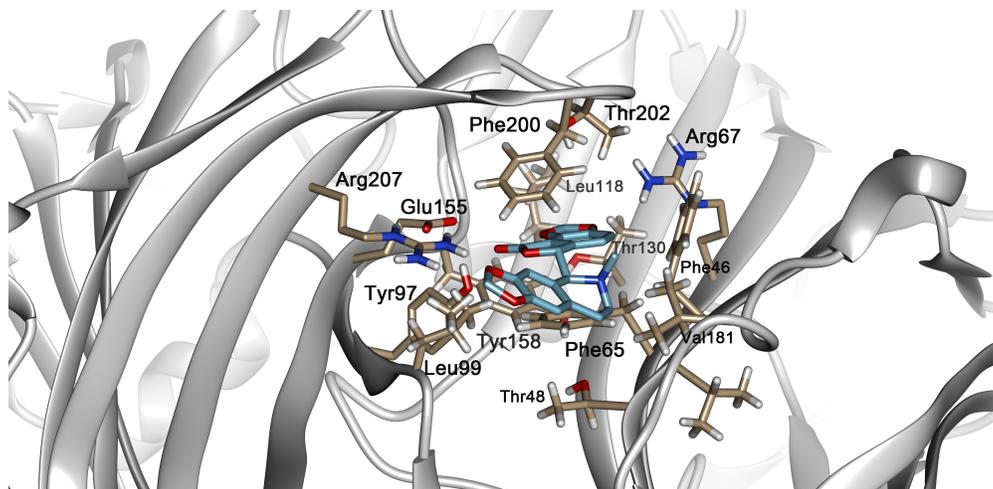


Figura 4.10: Modo de unión de Bicuculina hallado con ADV.

Bicuculina exploró distintas posiciones y orientaciones a lo largo de la simulación de DM, tal como se revela en su RMSD (Fig. 4.2). En algunas de ellas se encuentra parcialmente fuera de la cavidad de unión. Presentó únicamente interacciones hidrofóbicas con α_1 Phe46 y α_1 Val181, y un puente salino con α_1 Arg173. La simulación de DM puso de manifiesto que la pose encontrada inicialmente no es estable, al menos para la disposición de las cadenas laterales correspondiente a un estado con agonista unido.

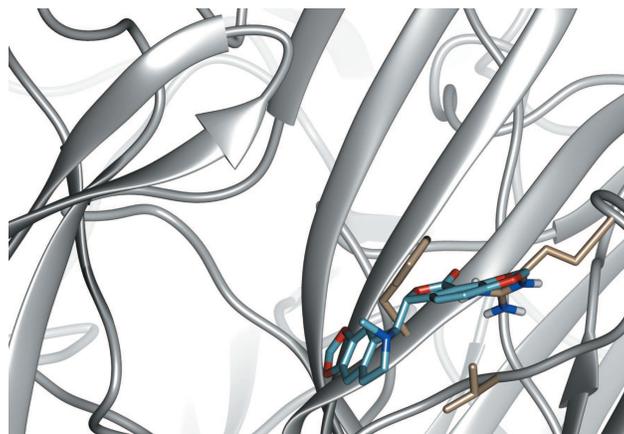


Figura 4.11: Configuración representativa de la dinámica molecular de bicuculina.

Gabazine

Gabazine, el otro antagonista analizado, es más pequeño y esto permitió que se encontraran modos de unión factibles por medio del empleo de ambos programas de docking

molecular.

Mediante HADDOCK se encontraron modos de unión clasificados en 10 conjuntos que contenían el 68 % de los complejos obtenidos. En el complejo más favorable, si bien el ligando interactúa con α_1 Arg67 mediante un puente salino y está a una distancia de contacto de β_2 Arg207, como se ha establecido experimentalmente, la supuesta interacción con α_1 Asp63 no está presente. Gabazine establece interacciones hidrofóbicas con α_1 Phe65 y β_2 Leu99, π -stacking con β_2 Phe200 y β_2 Tyr 205, así como también puentes de hidrógeno con β_2 Thr202 y β_2 Tyr157.

Curiosamente, ambos antagonistas mantuvieron contactos con residuos de la región de la lámina β_1 : α_1 Phe46, α_1 Val47 y α_1 Thr48 que no han sido explorados aún mediante métodos experimentales.

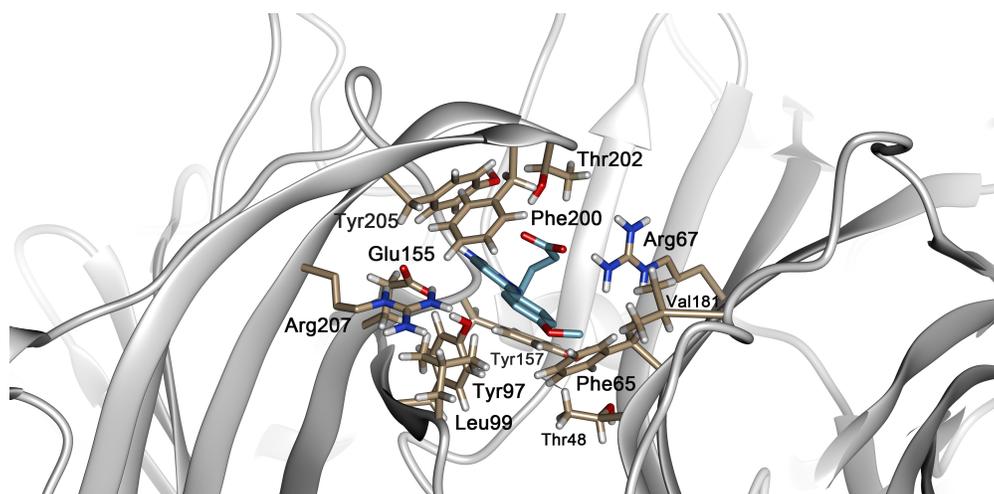


Figura 4.12: Mejor modo de unión para el complejo formado por gabazine y el receptor GABA_A. Este fue obtenido mediante HADDOCK.

Debido a que la estructura obtenida mediante HADDOCK posee mejores índices de *precisión* y *sensibilidad* se realizó una simulación de DM con dicha configuración inicial. Durante la simulación el ligando exploró distintas posiciones e interacciones con el receptor, ubicándose en mayor medida en una posición superior a la inicial, por encima del loop C (Figura 4.13). En concordancia con el modo de unión de la estircnina en el GlyR (PDB ID: 5CFB) [40], gabazine se posicionó en el extremo superior del sitio de unión. El loop C se abrió, favoreciendo la salida de gabazine de la cavidad, si bien el ligando se mantuvo unido a la cara

complementaria del sitio. Debido a que el ligando fue inestable a lo largo de la simulación y que no logró acomodarse en un modo correlacionable con los datos experimentales, no fue posible proponer un modo de unión para este ligando.

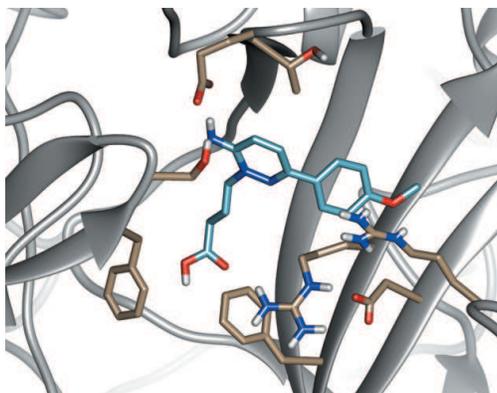


Figura 4.13: Configuración representativa de la dinámica molecular. El ligando está en la parte superior del sitio de unión.

4.3.2. Sitio de unión de las benzodiazepinas

En general, las benzodiazepinas clásicas (Figura 4.14.a) comparten una gran similitud en sus propiedades estereoquímicas, lo cual se refleja en los altos índices de Tanimoto (Fig. 4.16). Se ha observado experimentalmente que estos moduladores alostéricos positivos se unen al receptor en cercanías de los residuos γ_2 Ala79 y α_1 His102. De hecho, el actual modelo de farmacóforo¹ [259] sugiere que el 7-sustituyente de las benzodiazepinas clásicas debería estar localizado entre los residuos α_1 Val203, α_1 Val212 y α_1 Tyr210 del loop C, y α_1 His102 del loop A [260].

¹El farmacóforo es una abstracción que contempla aquellos aspectos estéricos y electrónicos comunes a un grupo de compuestos, responsables de establecer interacciones supramoleculares con estructuras biológicas específicas. Se definen a través de descriptores farmacofóricos: puentes de hidrógeno, sitios de interacción electrostática e hidrofóbica, definidas por átomos, centros de anillos y puntos virtuales. [258]

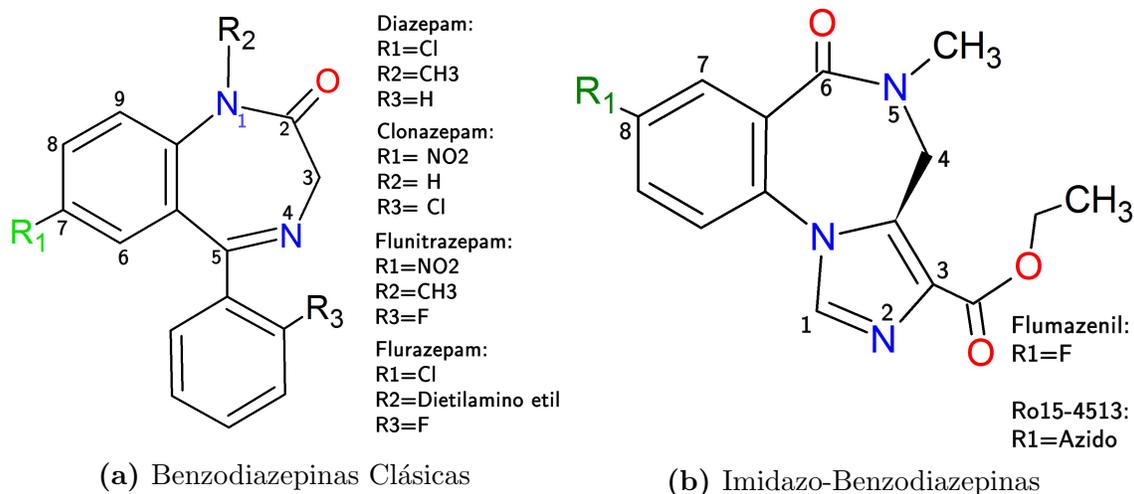


Figura 4.14: Numeración de los átomos de las BDZs e i-BDZs de acuerdo con IUPAC [261].

Por otro lado, las i-BDZs (Figura 4.14.b) son muy similares entre sí, pero el coeficiente de Tanimoto es muy pequeño respecto de las BDZs clásicas, lo que confirma que existen diferencias a nivel estructural, funcional y en su modo de unión. A pesar de ser agonistas, zolpidem y eszopiclona presentan coeficientes de Tanimoto muy bajos, lo cual es esperado debido a la prominente diferencia en sus geometrías.

Las benzodiazepinas clásicas y las i-BDZs, existen en dos conformaciones energéticamente favorables: M y P (Figura 4.15). Se ha concluido que la conformación M es la que posee mayor afinidad al receptor GABA_A [266].

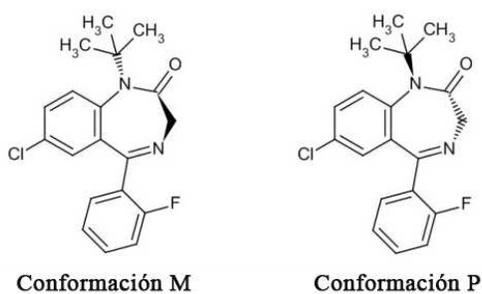


Figura 4.15: Conformación M y P para flurazepam. Estas se distinguen a partir del ángulo diedro de los átomos C2-C3-N4-C5: la conformación M posee un ángulo diedro negativo, mientras que el de la conformación P es positivo.

Diazepam	1	0.688	0.612	0.82	0.165	0.172	0.232	0.19
Clonazepam	0.688	1	0.815	0.591	0.174	0.172	0.225	0.192
Flunitrazepam	0.612	0.815	1	0.656	0.17	0.196	0.22	0.162
Flurazepam	0.82	0.591	0.656	1	0.168	0.194	0.225	0.215
Ro 15-4513	0.165	0.174	0.171	0.168	1	0.842	0.274	0.374
Flumazenil	0.172	0.172	0.196	0.194	0.842	1	0.277	0.383
Zolpidem	0.233	0.225	0.221	0.225	0.274	0.277	1	0.224
Eszopiclona	0.19	0.192	0.162	0.215	0.374	0.383	0.224	1
	Diazepam	Clonazepam	Flunitrazepam	Flurazepam	Ro 15-4513	Flumazenil	Zolpidem	Eszopiclona

Figura 4.16: Índices de Tanimoto calculados para los residuos del sitio de unión de gran afinidad de las benzodiazepinas.

Se calcularon los índices de *precisión* y *sensibilidad* para los resultados del docking de cada ligando (Tabla 4.4). La mejor conformación, de acuerdo a estos índices, fue simulada mediante DM y se re-calcularon dichos índices para la estructura representativa de cada simulación. La estructura representativa se obtuvo mediante la *clusterización* de la corrida de producción.

Tabla 4.4: Índices de *precisión* y *sensibilidad* de los modos de unión, obtenidos mediante docking molecular y DM, de ligandos del sitio de unión de las benzodiazepinas. Con * se señalan las mejores estructuras del docking.

Ligando	Software	Precisión	Sensibilidad
Diazepam	ADV *	0,81	0,76
	HADDOCK	0,81	0,81
	MD	1,00	0,83
Clonazepam	ADV *	0,92	0,65
	HADDOCK	0,71	0,59
	MD	0,92	0,92
Flunitrazepam	ADV *	0,92	0,80
	HADDOCK	0,78	0,43
	MD	0,93	0,88
Flurazepam	ADV *	0,75	0,75
	HADDOCK	0,87	0,81
	MD	0,93	0,81
Ro15-4513	ADV *	0,88	0,94
	HADDOCK	0,88	0,94
	MD	1,00	0,93
Flumazenil	ADV	0,88	0,83
	HADDOCK*	0,93	0,83
	MD 1	0,79	0,73
	MD 2	1,00	0,87
Zolpidem	ADV	0,87	0,93
	HADDOCK*	0,88	0,94
	MD	1,00	0,88
Eszopiclona	ADV *	0,93	0,93
	HADDOCK	0,50	0,77
	MD	1,00	0,81

Ambos índices fueron en general mejorados mediante las simulaciones de DM. Los residuos involucrados en las interacciones putativas obtenidas en los modos de unión con mejores

índices se encuentran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: Residuos del sitio de unión de las benzodiazepinas clasificados según su interacción con los ligandos.

Ligando	Verdaderos Positivos	Falsos Positivos	Falsos Negativos
Diazepam	α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Asn103, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Asn60, γ_2 Phe77	-	α_1 Thr207, γ_2 A79
Clonazepam	α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser206, α_1 Thr207, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Ala79, γ_2 Met130, γ_2 Thr142	γ_2 Asn60	α_1 Ser159
Flunitrazepam	α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Ser159, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser205, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Ala79, γ_2 Met130, γ_2 Arg132, γ_2 Thr142	γ_2 Asn60	α_1 Thr207, γ_2 Ser61
Flurazepam	α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Ser159, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser205, α_1 Thr207, α_1 Tyr210, γ_2 Tyr58, γ_2 Asn60, γ_2 Phe77, γ_2 Arg132, γ_2 Thr142	γ_2 Asp192	α_1 Gly201, γ_2 Ala79, γ_2 Met130
Ro15-1543	α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Gly158, α_1 Ser159, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser205, α_1 Thr207, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Met130, γ_2 Thr142		γ_2 Thr81
Flumazenil	α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Ser159, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser205, α_1 Thr207, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Ala79, γ_2 Thr142	-	α_1 Ser206, γ_2 Thr81
Zolpidem	α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Gly158, α_1 Ser159, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser205, α_1 Thr207, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Ala79, γ_2 Thr142	-	γ_2 Thr81, γ_2 Met130
Eszopiclona	α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Gly158, α_1 Ser159, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser205, α_1 Thr207, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Ala79, γ_2 Thr142	-	γ_2 Arg132, γ_2 Arg144, γ_2 Met130

Resultados generales de la dinámica molecular

La estabilidad de las simulaciones de Dinámica Molecular del receptor en complejo con los distintos ligandos fue evaluada mediante el cálculo del RMSD tomando como referencia la estructura inicial. El cálculo fue realizado a partir de los átomos $C\alpha$ y realizando un ajuste a la traslación y rotación. Como se puede observar en la Figura 4.17, todos los sistemas excepto el de eszopiclona y la primera simulación con diazepam, se mantuvieron estables luego de los 60 ns aproximadamente y el valor del RMSD nunca superó los 0,5 nm. Los valores fueron del mismo orden de magnitud que aquellos obtenidos para la simulación del modelo APO simulado bajo las mismas condiciones.

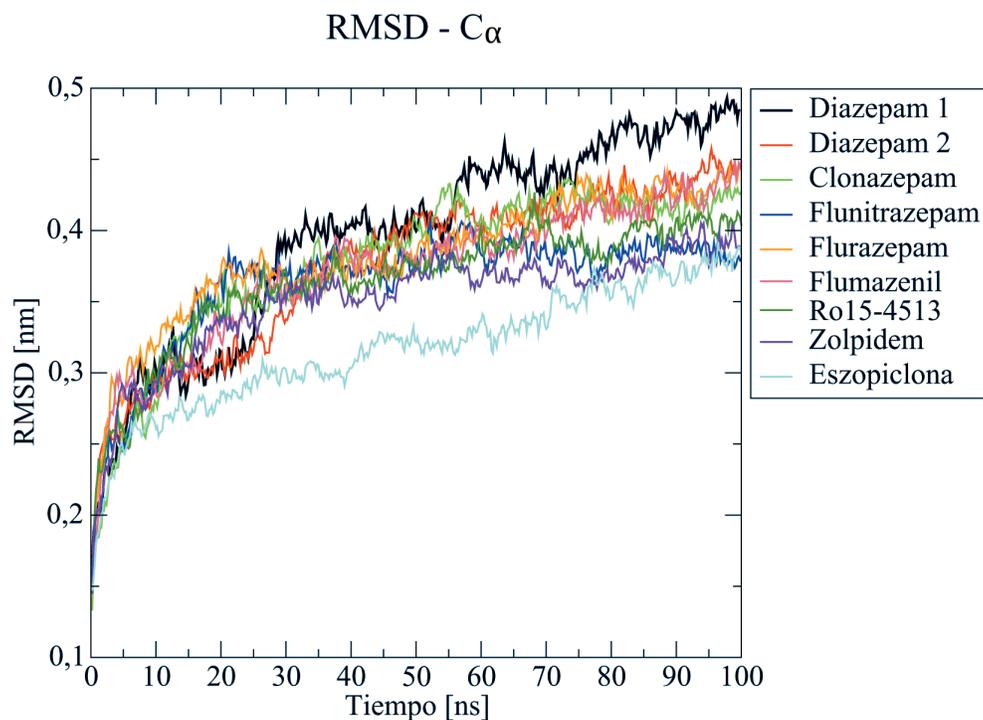


Figura 4.17: Gráfico de $C\alpha$ – RMSD para cada una de las simulaciones realizadas para los complejos formados por el receptor $GABA_A$ y los ligandos. Luego de un gran aumento inicial, los sistemas se estabilizan hacia la mitad de las simulaciones.

Con el objetivo de evaluar los movimientos globales de los ligandos dentro de los sitios de unión se calculó el RMSD de los ligandos respecto de las conformaciones iniciales (Fig. 4.18). Se realizaron ajustes respecto de la traslación y la rotación de la proteína. Los resultados resaltaron la estabilidad de los ligandos en su sitio de unión, una propiedad estrechamente relacionada con la confiabilidad del modelo de interacción propuesto [262].

Los ligandos diazepam y flurazepam presentaron las mayores desviaciones (Figura 4.18), debido a un cambio drástico inicial en la conformación, si bien luego se mantuvieron estables. El mismo análisis se puede realizar cualitativamente mediante la visualización de las trayectorias. La re-orientación inicial podría estar relacionada con los valores inferiores de *sensibilidad*, en comparación con los de otros ligandos. A pesar de que se pueden considerar altos, los contactos considerados Falsos Positivos podrían generar fuerzas repulsivas que conducirían a los movimientos observados.

El resto de los compuestos sufrieron cambios menores en la posición y orientación dentro de la cavidad y los valores de RMSD se podrían correlacionar con pequeños movimientos debido a la relajación de las cadenas laterales de los residuos vecinos.

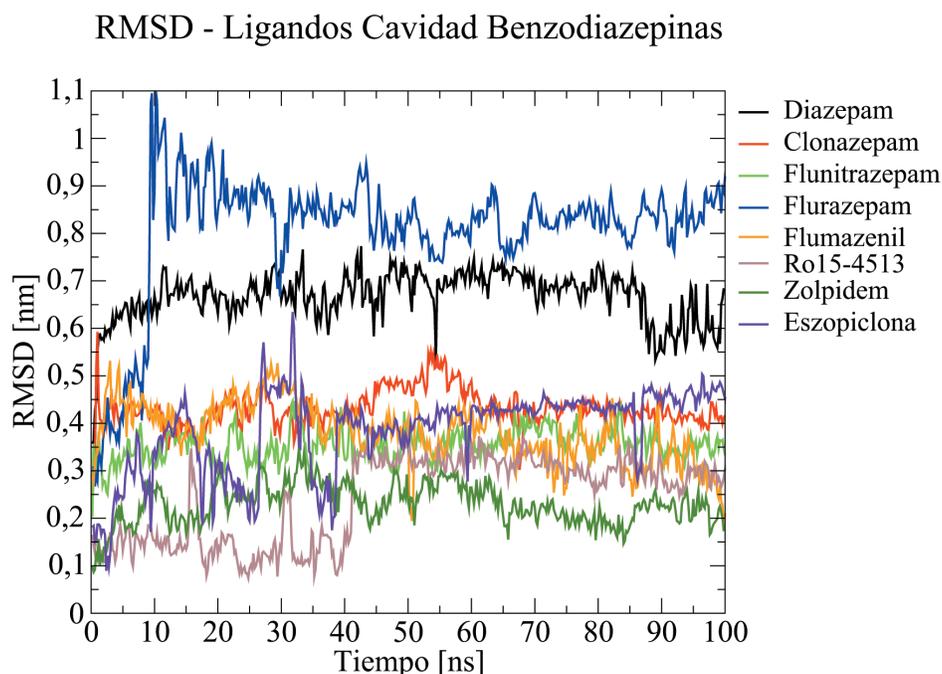


Figura 4.18: Desviación cuadrática media de los ligandos respecto de su conformación inicial a lo largo de la simulación de dinámica molecular.

Además, con el fin de evaluar cambios conformacionales en los ligandos, se calculó el RMSD de la posición de los átomos de los ligandos, a partir del ajuste sobre ellos mismos (Figura 4.19). Eszopiclona, flurazepam y flunitrazepam son los ligandos que mayores modificaciones presentan.

RMSD - Ligandos

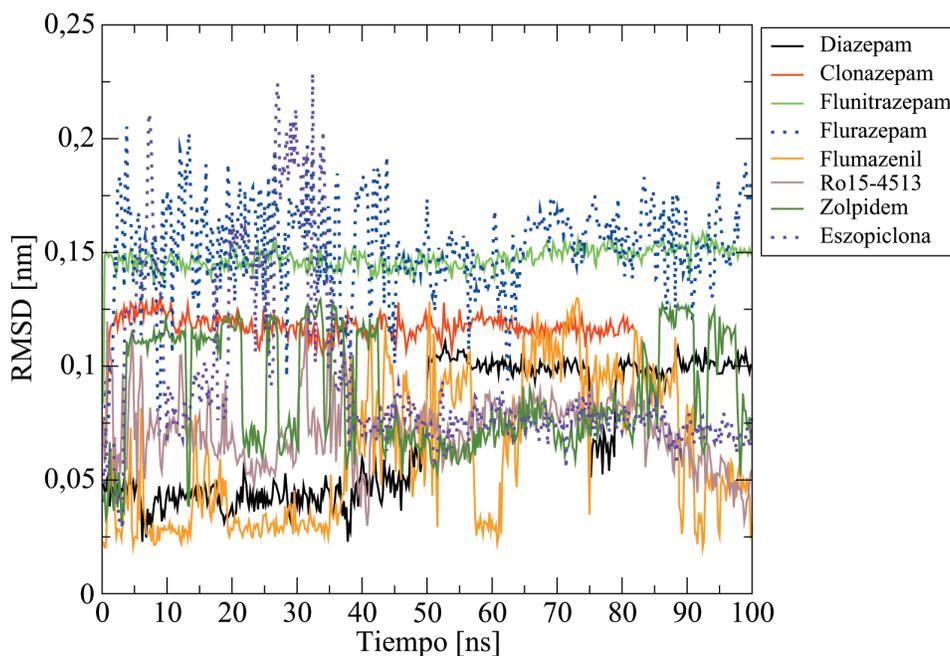


Figura 4.19: Desviación cuadrática media de los ligandos respecto de su conformación inicial a lo largo de la simulación de dinámica molecular, calculado a partir de la superposición sobre los propios átomos.

Diazepam

Para el docking de diazepam se empleó evidencia experimental que indica que el átomo de cloro de este ligando interactúa con el residuo α_1 His102, y que el átomo C3 interactúa con el extremo del loop C a través de α_1 Thr207 y α_1 Ser206. Dichas interacciones fueron incorporadas a la simulación de docking guiado como residuos activos.

De los 200 modelos generados por HADDOCK, un 98,0% fue agrupado en 7 conjuntos. En el complejo de menor HADDOCK *score* el anillo fenil de diazepam se ubica dentro de la cavidad, como se ha predicho experimentalmente [259].

En el modelo seleccionado, el anillo se encuentra ubicado en una cavidad hidrofóbica conformada por los residuos α_1 Phe100, γ_2 Phe77, α_1 Tyr160 y α_1 Tyr210. Además el sustituyente N-metil (Figura 4.14.1) está orientado hacia afuera de la cavidad de unión [263] y el carboxilo, número 2 en la figura 4.14.1, está en contacto con α_1 Ser206. Diazepam interactúa mediante π -stacking con γ_2 Tyr58 y γ_2 Phe77, e hidrofóticamente con γ_2 Thr142. Así mismo, son preservadas las restricciones impuestas: el átomo de cloro apunta hacia α_1 His102, α_1 Asn103 y γ_2 Asn60, y el átomo C3 se ubica en cercanías de los residuos α_1 Thr207 y α_1 Ser206.

Modelos computacionales publicados anteriormente orientaban al anillo fenil en un plano paralelo a la membrana y a los anillos aromáticos de α_1 Phe100 y γ_2 Phe77. En contraste, en nuestro modelo el anillo fenil se orienta en forma paralela a γ_2 Phe77 y α_1 Tyr160 pero se dispone perpendicular al anillo de α_1 Phe100 y a la membrana.

Por otro lado, γ_2 Arg194 no está ubicado en el sitio de unión en nuestro modelo. γ_2 Met130, ubicada en la parte posterior y superior del sitio, no está en contacto directo con diazepam, pero sí lo está con residuos que interactúan directamente con el ligando como α_1 Tyr210 y α_1 Tyr160.

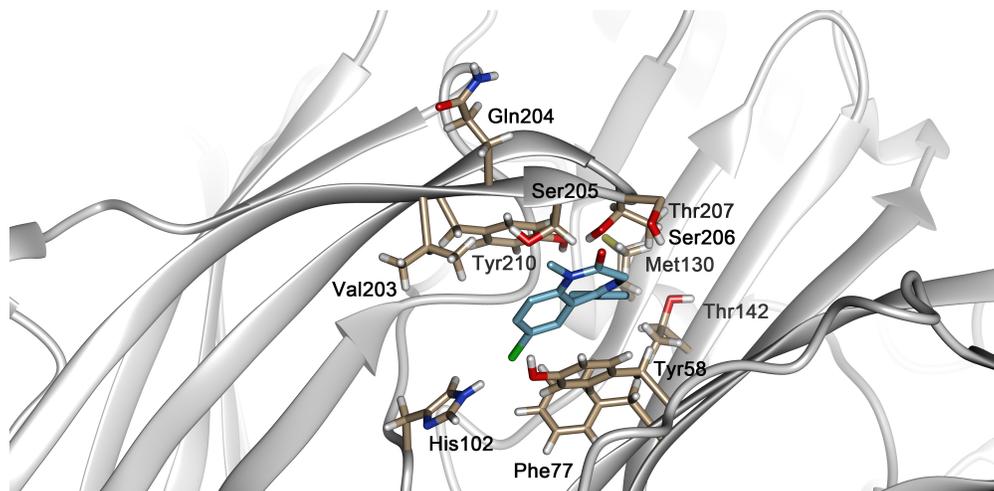


Figura 4.20: Modo de unión de diazepam obtenido mediante HADDOCK.

Los valores de *precisión* y *sensibilidad* son altos para el mejor modelo. Además, esta configuración concuerda con aquellas propuestas en estudios *in silico* previos [264, 265]. La pose encontrada para diazepam se corresponde con una de las propuestas por Richter *et al.* [266], aunque no la más probable. Ellos propusieron que el modo de unión más favorable contiene al anillo fenil afuera de la cavidad de unión, en contraste con la ubicación de dicho anillo en el centro de la cavidad hidrofóbica en nuestro modelo.

El mejor modo de unión obtenido mediante ADV posee un índice de *sensibilidad* inferior. En este caso el ligando está involucrado en interacciones de tipo hidrofóbicas con los residuos α_1 Tyr160, α_1 Thr207, γ_2 Tyr58 γ_2 Phe77 y γ_2 Thr142.

Se realizaron tres simulaciones de DM que involucran este ligando. En primer lugar, la simulación con dos moléculas de GABA (ver sección 4.3.1), en segundo lugar la pose obtenida mediante HADDOCK, y por último la pose generada por ADV. En los tres casos diazepam

se acomodó de manera muy similar en la cavidad (Figura 4.21). Sin embargo, las diferencias tanto en el ligando como en las cadenas laterales generaron que la configuración obtenida de la simulación de la pose de ADV presente mayores índices de *precisión* y *sensibilidad*.

El modo de unión de diazepam determinado por la *clusterización* de la DM de la estructura de ADV, no presenta falsos positivos. En cuanto a los falsos negativos, se observó que en la trayectoria α_1 Thr207 y γ_2 Ala79 se mantuvieron alejados de ligando; el primero debido a una apertura de la punta del loop C, el segundo debido a la reorientación de diazepam en la cavidad. Diazepam mantuvo interacciones hidrofóbicas con α_1 Phe100, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58 y γ_2 Phe77, puentes de hidrógeno con α_1 Ser205, γ_2 Asn60 y π -stacking con α_1 His102.

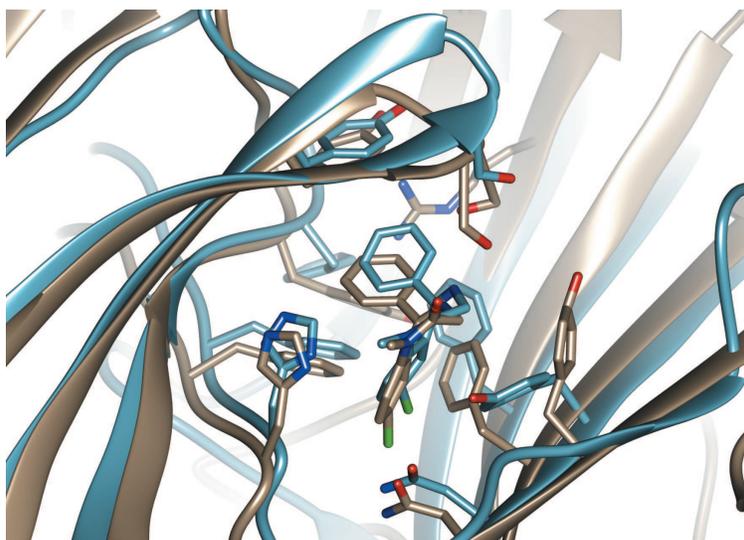


Figura 4.21: Los modos de unión de diazepam de acuerdo con las simulaciones de dinámica molecular a partir de las estructuras obtenidas con HADDOCK (celeste) y ADV (beige). Para realizar la comparación se superpusieron las subunidades α_1 , observando una clara correspondencia en la pose de diazepam. Sin embargo, es necesario aclarar que la subunidad γ_2 no queda superpuesta sino que, entre las simulaciones, hay una rotación de esta subunidad que imposibilita la superposición simultánea de las dos subunidades y el ligando. La rotación respecto del modelo inicial de la subunidad γ_2 se produjo en sentido anti-horario para la estructura de ADV (y la simulación con moléculas da GABA) y en sentido contrario para la estructura de HADDOCK.

Clonazepam

El docking de clonazepam mediante HADDOCK y AutoDock Vina dio como mejores resultados modelos similares, que difieren únicamente en la orientación del anillo cloro-fenil. Así mismo, dichos modelos pueden correlacionarse con información experimental.

El docking guiado produjo 9 grupos de configuraciones conteniendo el 80,5% de los modelos refinados. En el complejo con el mejor puntaje según HADDOCK el grupo nitro se ubica vecino a α_1 His102, α_1 Val203 y γ_2 Tyr58, el átomo C3 se encuentra cercano a α_1 Thr207, el carbonilo forma un puente de hidrógeno con α_1 Ser206. El anillo cloro-fenil interactúa con α_1 Tyr160 y α_1 Thr207. Se observan interacciones hidrofóbicas con α_1 Tyr160, α_1 Tyr210 y γ_2 Phe77. Por otro lado los residuos α_1 Val212, α_1 Lys156 y α_1 Ser159 rodean al ligando pero no establecen contactos con éste.

Si bien el mejor modelo de acuerdo a AutoDock Vina es posible, el segundo representa más adecuadamente los datos experimentales. El grupo nitro forma un puente de hidrógeno con α_1 His102 y γ_2 Tyr58, mientras que α_1 Tyr210 forma dicho enlace con el NH del anillo benzodiazepínico. El anillo cloro-fenil se ubica cercano a γ_2 Tyr58 y forma una interacción del tipo π -stacking con γ_2 Phe77. El extremo del loop C interactúa con el ligando a través de distintos puntos, en particular, mediante un puente de hidrógeno con α_1 Ser206. Presenta interacciones del tipo hidrofóbicas con los residuos α_1 Phe100, γ_2 Asp56, γ_2 Ala79, γ_2 Met130, γ_2 Leu140 y γ_2 Thr142. Por el contrario, α_1 Val203 y α_1 Val212 bordean la cavidad de unión pero no contactan directamente al ligando.

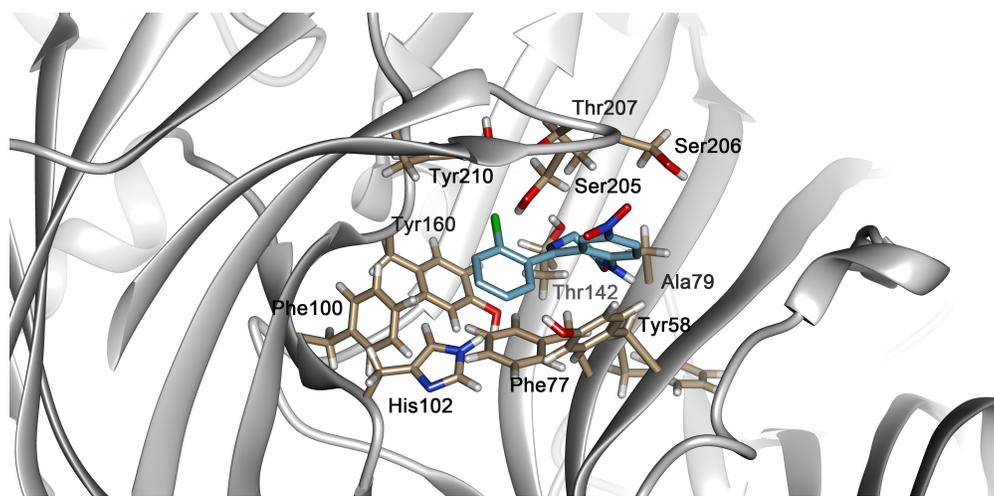


Figura 4.22: Modo de unión de clonazepam obtenido mediante el docking realizado con ADV.

La pose de clonazepam mejoró considerablemente a lo largo de la trayectoria de DM. A partir de la estructura representativa se observó que mantiene interacciones hidrofóbicas con α_1 Phe100, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser206 α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Ala79, γ_2 Met130 y γ_2 Asp192; que establece puentes de hidrógeno con α_1 Tyr160, α_1 Thr207,

α_1 Tyr210 y γ_2 Thr142; e interactúa mediante π -stacking con α_1 His102. El modo de unión de clonazepam obtenido de la DM exhibe un falso positivo debido a que γ_2 Asn60 está a una distancia de contacto del ligando pero no establece ninguna interacción natural con él. Por el contrario, α_1 Ser159 constituye un falso negativo ya que en analogía con la unión de flunitrazepam, debería interactuar con el ligando pero no lo hace.

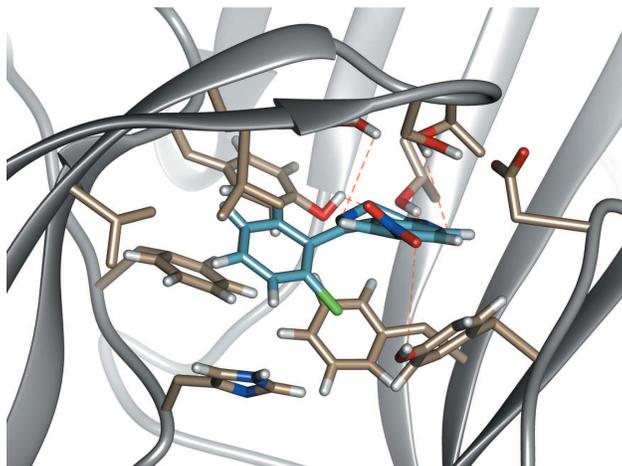


Figura 4.23: Durante de la simulación de DM del complejo obtenido con ADV clonazepam adoptó distintas conformaciones permitiendo a los contactos mejorar considerablemente. La orientación de clonazepam se asemeja a la hipotetizada para las BDZs clásicas: el anillo principal yace en un plano paralelo a la membrana, el sustituyente 7, cercano a α_1 His102, apunta hacia afuera de la cavidad y el anillo fenil se ubica dentro de la denominada *caja hidrofóbica*.

Flunitrazepam

El docking de flunitrazepam con HADDOCK produjo 13 grupos representando el 83,0 % de los modelos refinados. Sin embargo, los mejores modelos mostraron índices de *precisión* y *sensibilidad* bajos. El complejo de mejor puntaje presenta unas pocas interacciones con α_1 Lys156, α_1 Val203, α_1 His102 y γ_2 Tyr58.

En el segundo mejor resultado, de acuerdo con AutodockVina, flunitrazepam se orienta de manera tal que su grupo nitro realiza un puente de hidrógeno con α_1 His102, y se encuentra a una distancia considerada de contacto de γ_2 Tyr58 y γ_2 Phe77. El anillo fenil interactúa con γ_2 Tyr58 y residuos del extremo del loop C. El anillo benzodiazepínico está en contacto con γ_2 Met130, γ_2 Ala79 y γ_2 Thr142. Además, γ_2 Leu140 y γ_2 Asp56 rodean al sitio junto con los residuos α_1 Phe100, α_1 Tyr210 y α_1 Tyr160.

Por comparación con diazepam, el anillo fluoro-fenil debería estar localizado dentro de la

cavidad hidrofóbica en la región posterior del sitio de unión. Esta diferencia podría deberse a que la química del grupo difiere por la presencia del fluor y, por lo tanto, alteraría la forma en la que se une. Así mismo, podría ser una forma alternativa de unión para las benzodiazepinas clásicas, ya que esta orientación del ligando dentro de la cavidad se correlaciona con la orientación obtenida por Richter y colaboradores [266] para diazepam.

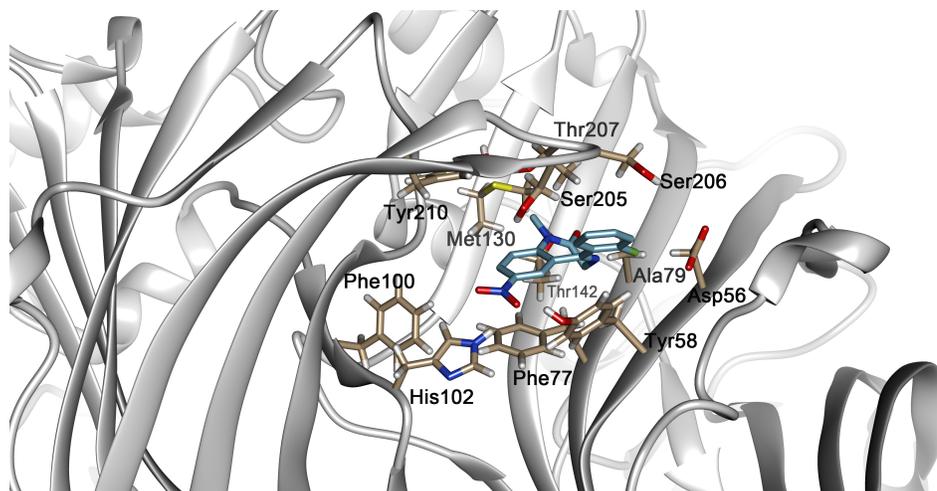


Figura 4.24: Modo de unión de flunitrazepam obtenido mediante ADV.

Se empleó el complejo obtenido mediante ADV para realizar una simulación de DM. La trayectoria fue *clusterizada*, y se encontró que la configuración representativa está caracterizada por la interacción de flunitrazepam, mediante puentes de hidrógeno, con α_1 His102, γ_2 Arg132 y γ_2 Thr142, y mediante interacciones hidrofóbicas con α_1 Phe200, α_1 Ser159, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser205, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77 y γ_2 Met130 (Figura 4.25). Debido a la apertura del extremo del loop C, el ligando no interactúa con α_1 Thr207. Así mismo, γ_2 Asn60 y γ_2 Ser61 pertenecen al sitio de unión, aunque se encuentran a una distancia mayor a la de contacto. Durante la simulación las cadenas laterales de los residuos circundantes se acomodaron en la cavidad, mientras que el ligando mantuvo su posición y orientación; el resultado es una sutil mejora de ambos índices.

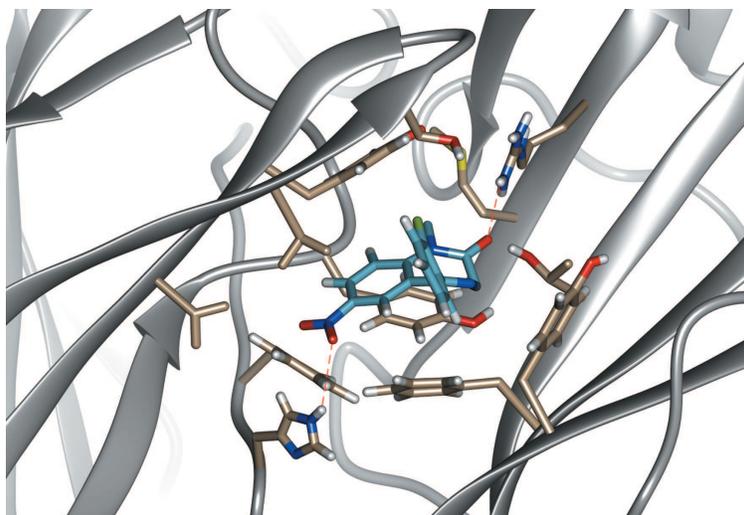


Figura 4.25: Modo de unión de flunitrazepam luego de la *clusterización* de la simulación de DM.

Flurazepam

A pesar de la escasez de datos experimentales sobre el modo de unión de flurazepam, los complejos obtenidos mediante HADDOCK y AutoDock Vina coinciden con ellos.

Un 85 % de los modelos obtenidos mediante HADDOCK pudo ser agrupado. El *cluster* más numeroso se destacó de los demás por la cantidad de estructuras y el bajo puntaje energético. La estructura representativa orienta al átomo de flúor hacia el interior de la cavidad y se encuentra cercano a α_1 His102 y γ_2 Tyr58, mientras que el átomo de cloro se ubica próximo a α_1 Phe100. El grupo dietilamino-etil está en contacto con γ_2 Phe77 y se orienta hacia γ_2 Asp56, γ_2 Ala79 y γ_2 Thr142. El anillo benzodiazepínico está orientado de manera tal que el grupo carbonilo apunta hacia la subunidad γ_2 , particularmente hacia γ_2 Tyr58.

Por otro lado, el mejor modelo obtenido con AutoDock Vina presenta una orientación similar a la adoptada por el bromoflurazepam al interactuar con el receptor procariótico ELIC en una de sus estructuras cristalográficas (PDB ID: 4A98) [267]. Si bien los índices de *precisión* y *sensibilidad* calculados fueron levemente inferiores, se seleccionó este modo de unión para continuar el análisis.

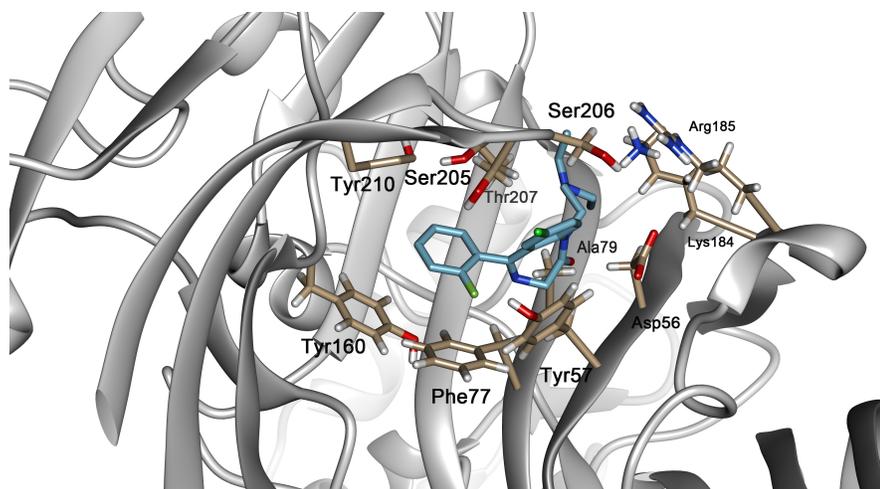


Figura 4.26: Modo de unión de flurazepam obtenido con ADV.

El modo de unión de flurazepam obtenido mediante DM, a partir la *clusterización* de la simulación, muestra al ligando estableciendo interacciones hidrofóbicas con α_1 Phe100, α_1 Ser159, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser205, γ_2 Tyr58, γ_2 Asn60 γ_2 Phe77, γ_2 Thr142 y γ_2 Asp192, puentes de hidrógeno con α_1 Tyr160 y π *stacking* con α_1 His102. Adicionalmente, se sabe que la γ_2 Arg132 al ser mutada por una cisteína reduce la afinidad de unión de este ligando. Este residuo se encuentra en el rango de contacto sin participar en una interacción particular. Por otro lado, α_1 Gly201, γ_2 Ala79 y γ_2 Met130 aparecen lejanos respecto del ligando.

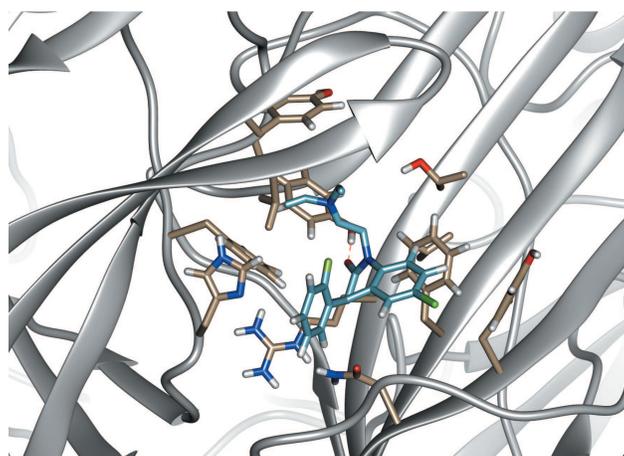


Figura 4.27: Modo de unión de flurazepam luego de la *clusterización* de la simulación de DM.

Ro15-4513

Ro15-4513 es una i-BZD que actúa como modulador alostérico negativo mediante la inhibición de la acción del neurotransmisor GABA. Las simulaciones de docking molecular dieron como mejores resultados dos poses con iguales puntajes de *precisión* y *sensibilidad* que difieren entre sí por una rotación de 180° respecto de su eje principal, orientando el anillo imidazo hacia adentro (ADV) o hacia afuera de la cavidad (HADDOCK) (Figura 4.28). En ambos modelos el sustituyente 3' del anillo se encuentra dentro de la distancia de contacto del residuo γ_2 Ala79, el grupo azido apuntando hacia α_1 His102, α_1 Val203, α_1 Val212, α_1 Gly158 del loop B y α_1 Tyr210. Se ha observado *in vitro* que este residuo interactúa directamente con el ligando [268].

Debido a que los puntajes eran iguales, se procedió a la simulación de DM de los dos sistemas. El modelo que posee el anillo imidazo apuntando hacia adentro de la cavidad mostró una mejora en la *precisión* y la *sensibilidad* y se estabilizó en una configuración con el loop C en una conformación ligeramente más abierta. Por otro lado, el modelo de HADDOCK presentó una disminución en los índices y por lo tanto fue descartada.

Los resultados obtenidos en la DM son consistentes con modelos previos, ya que predicen una orientación del anillo imidazo hacia el interior de la cavidad, dejando los átomos de las posiciones 4 y 5 del anillo principal expuestos hacia el exterior, similar al comportamiento de los grupos N-metil y carbonil del diazepam. Este modo de unión es también consistente con el encontrado para flumazenil en la estructura experimental PDB ID: 6D6U.

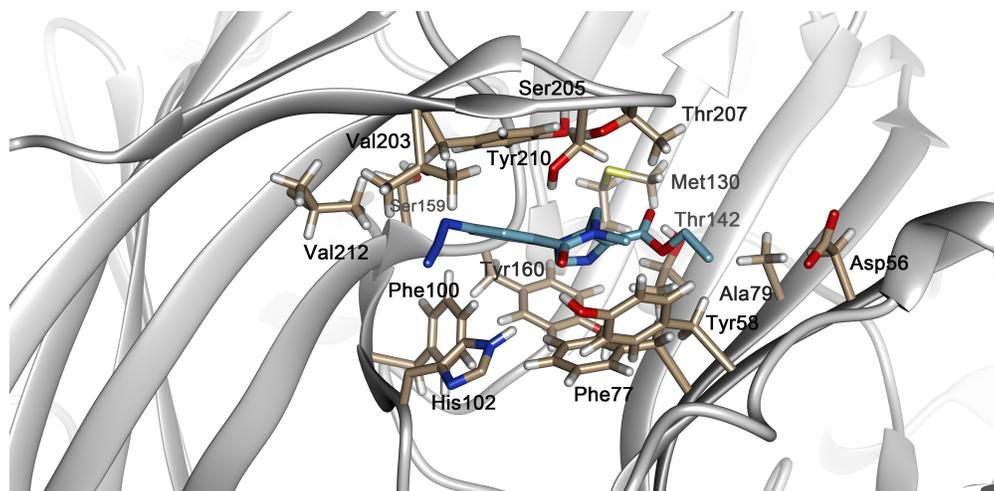


Figura 4.28: Modo de unión de Ro15-4513.

El modo de unión extraído de la *clusterización* de la DM (Figura 4.29) presenta interacciones hidrofóbicas entre el ligando y α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Gly158, α_1 Ser159, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser205, α_1 Thr207, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Ala79, γ_2 Met132 y γ_2 Thr142, y un puente salino con γ_2 Arg97, sobre el cual no hay información experimental.

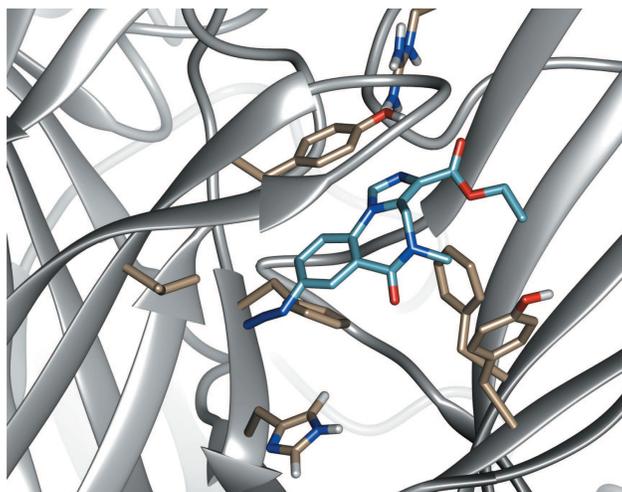


Figura 4.29: El modo de unión del modulador negativo Ro15-4513 obtenido de la DM.

Con el objetivo de evaluar la influencia del rotámero de la α_1 His102, que difiere del observado en la estructura experimental y del hallado en modos de unión de diazepam y flurazepam, se realizó el docking de este ligando en el receptor PDB ID: 6D6U. No se encontraron diferencias apreciables en el modo de unión (Figura 4.30), por lo tanto la orientación del α_1 His102 no sería determinante para la unión de ro15-4513.

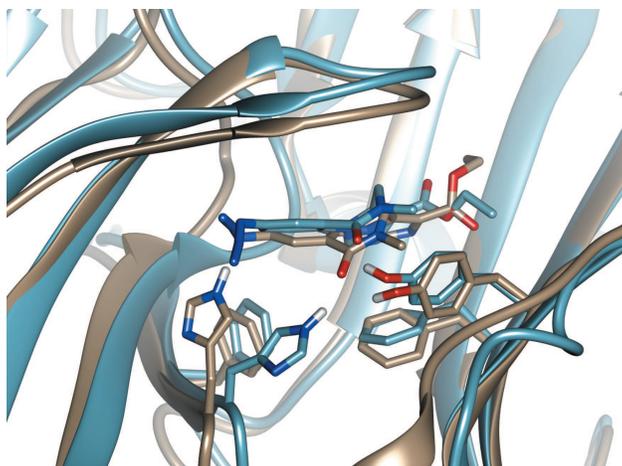


Figura 4.30: Comparación de los mejores modos de unión, calculados con ADV, de ro15-4513 y el receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ modelado (celeste) y experimental (beige).

Flumazenil

Las mejores poses obtenidas para flumazenil con ambos programas mostraron una orientación del ligando tal que el sustituyente 3' del anillo imidazol se halla cercano al aminoácido γ_2 Ala79, el sustituyente 7 apunta hacia α_1 His102, α_1 Val203, α_1 Val212 y α_1 Gly158 del loop B y el anillo imidazo está orientado hacia afuera de la cavidad. Todo de acuerdo con la información experimental [259, 268–270] (ver Tablas A.3 y A.4).

Sin embargo, al realizar la simulación de dinámica molecular del complejo, los índices decrecieron, indicando un deterioro de las interacciones. Al comparar la configuración inicial con la obtenida para ro15-4513 se observó que la única diferencia es una rotación de 180° respecto de su eje principal: en un caso el anillo imidazo apuntaba hacia el interior de la cavidad (estos complejos resultaron ser más estables), en el otro apuntan hacia el exterior (tal es el caso de la conformación obtenida mediante HADDOCK, que es inestable en las simulaciones de DM).

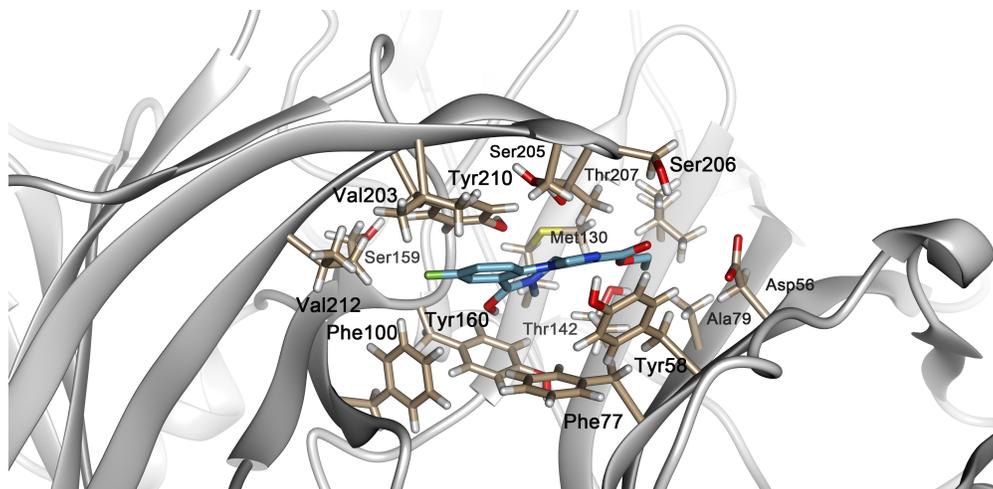


Figura 4.31: Modo de unión de flumazenil obtenido con HADDOCK. Este fue seleccionado inicialmente para realizar las simulaciones de DM.

En consecuencia, se seleccionó el modo de menor energía de ADV que presentara dicha orientación. Esta configuración presenta interacciones hidrofóbicas con α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Val212 γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Ala79, γ_2 Met130, γ_2 Thr142 y puentes hidrógeno con α_1 Ser159 y α_1 Ser205. En este caso los índices de *precisión* y *sensibilidad* fueron similares a los obtenidos para las otras poses (Tabla 4.5). Se simuló mediante dinámica molecular dicha estructura demostrando ser más estable. A partir de la *clusterización* se obtuvo el complejo representativo, el cual se encuentra caracterizado por las interacciones de tipo hidrofóbico entre el ligando y α_1 Phe100, α_1 Ser159, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Val212, α_1 Tyr210, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Ala79 y γ_2 Thr142, y puentes de hidrógeno con α_1 Ser205 y α_1 Thr207. No se contabilizó al residuo γ_2 Ser61 como falso negativo, dado que no hay forma en la cual el ligando pueda interactuar simultáneamente con este residuo y con, por ejemplo, γ_2 Ala79 o α_1 Tyr160.

Este modo de unión fue corroborado finalmente con la reciente publicación de la estructura del receptor $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, en la cual se observa al ligando en una pose similar a la obtenida mediante docking (Figura 4.32a).

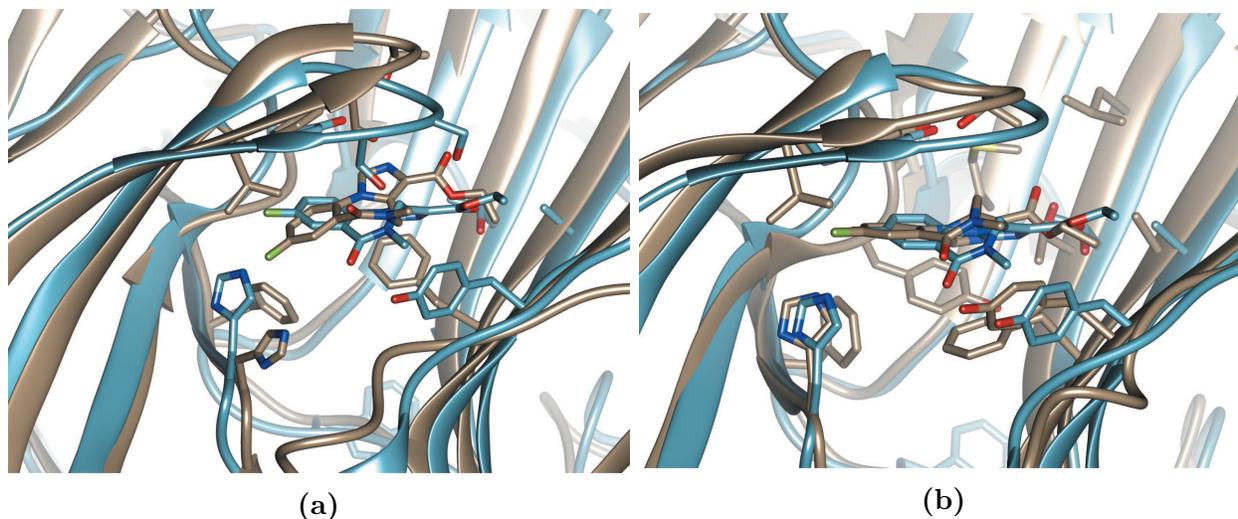


Figura 4.32: Comparación del complejo receptor-flumazenil experimental (PDB ID: 6D6U) y los obtenidos *in silico*. a. Modelo de interacción extraído de la DM del mejor complejo según ADV; b. Modelo de interacción obtenido con ADV previa modificación del rotámero de α_1 His102.

Mediante la comparación con la estructura experimental se detectó que la conformación de flumazenil utilizada corresponde a la conformación tipo P, mientras que la observada en PDB ID: 6D6U es tipo M (Figura 4.15). Ante este resultado, se realizó un estudio de docking con ADV con la estructura de flumazenil experimental y el receptor modelado, introduciendo un único cambio en éste: el rotámero de la α_1 His102, que tanto en el receptor experimental, como en otros modos de unión hallados (diazepam y flurazepam), es distinto al propuesto por el modelo. Este docking resultó en un complejo muy similar al experimental; el RMSD, calculado a partir de la superposición de las subunidades α_1 , para las dos poses de flumazenil fue de 1,6 Å, un valor que refleja conformaciones muy similares (Figura 4.32b).

Se compararon las interacciones observadas tanto en la estructura experimental como las observadas en las dos poses propuestas (Tabla 4.7). De aquí se pudo concluir en primer lugar que realizar las simulaciones de docking con la estructura en el estado M mejora los contactos, esto está en concordancia con estudios que proponen que esta conformación es la de mayor afinidad [266]. Si bien los residuos con los que interactúa son los mismos, difieren en el tipo de interacciones que son fuertemente dependientes de la conformación de las cadenas laterales. Por otro lado, se observaron discrepancias entre los datos provenientes de otras técnicas experimentales (*Photoaffinity-labelling*, SCAM, mutaciones, etc.) en relación a la estructura obtenida por criomicroscopía electrónica. Esto se debe a que los residuos

propuestos experimentalmente no necesariamente interactúan con el ligando, sino que pueden ser parte importante del sitio de unión o del camino de activación por su interacción con otros aminoácidos; o bien su mutación puede generar impedimentos estéricos para la unión del ligando. Independientemente de la causa de su importancia para la acción de flumazenil, de la larga lista de aminoácidos propuestos como interactuantes, no todos lo son en la estructura experimental. Finalmente, es necesario hacer la salvedad de que la estructura experimental posee una resolución baja ($\sim 3,9$ Å), por lo tanto, el detalle de las interacciones debe tomarse como una guía pero no como un dato exacto.

Tabla 4.7: Residuos involucrados en la interacción con flumazenil para tres complejos: el obtenido a partir de la dinámica molecular del docking inicial con ADV (Modelo DM), el proveniente del docking de la conformación M con ADV (Modelo Vina) y el de la estructura PDB ID: 6D6U (Experimental).

Interacciones	Modelo DM	Modelo ADV	Experimental
Hidrofóbicas	α_1 Phe100, α_1 Ser159, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Val212, α_1 Tyr210, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Ala79, γ_2 Thr142	α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Val203, α_1 Ser205, α_1 Ser206, α_1 Thr207, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Ala79	α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Ser205, α_1 Thr207, α_1 Tyr210, α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Ala79, γ_2 Met130, γ_2 Thr142
Puentes de Hidrógeno	α_1 Ser205, α_1 Thr207	α_1 Ser205, γ_2 Tyr58, γ_2 Thr142	α_1 Ser206
π -stacking	-	-	γ_2 Phe77

Zolpidem

Los estudios de docking dieron como resultado conformaciones muy similares con índices de *sensibilidad* y *precisión* comparables (Tabla 4.5). La mayoría de las interacciones observadas fueron del tipo hidrofóbicas, lo cual haría que la unión de este ligando se vea más afectada por el tamaño y forma de la cavidad que por la interacción con un aminoácido particular [106].

La mejor configuración se pudo relacionar con estudios computacionales previos realizados a partir de un modelo diferente [54] y con el modelo del farmacóforo [259]. Sin embargo, en la pose propuesta, no hay interacción directa entre el ligando y el loop F a diferencia de lo propuesto en la literatura. Se observan interacciones de tipo hidrofóbicas con los residuos

α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Gly158, α_1 Ser159 α_1 Tyr160, α_1 Val203, α_1 Val212, γ_2 Asp56, γ_2 Tyr58, γ_2 Ala79, γ_2 Met130 y γ_2 Thr142, π -stacking con α_1 Tyr210 y γ_2 Phe77, y puentes de hidrógeno con α_1 Ser206, α_1 Thr207 y α_1 Tyr210.

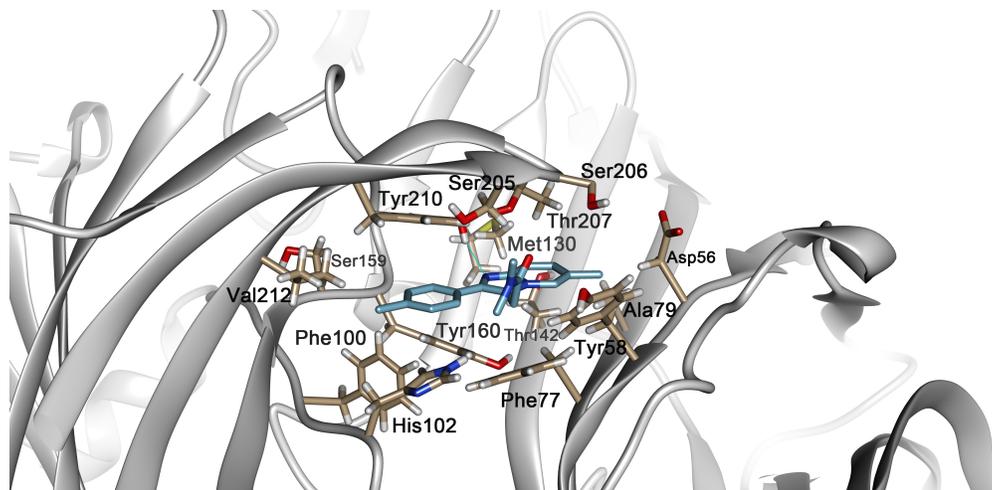


Figura 4.33: Modo de unión de zolpidem obtenido a partir de HADDOCK.

El ligando se mantuvo estable a lo largo de la simulación de DM y conservó su orientación a lo largo de la misma (Figura 4.34). En la simulación el ligando interactuó mediante contactos hidrofóbicos con α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Gly158, α_1 Ser159, α_1 Val203, α_1 Tyr210 α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Ala79 y γ_2 Thr142, π -stacking con γ_2 Phe77, y puentes de hidrógeno con α_1 Tyr160, α_1 Ser205 y α_1 Thr207.

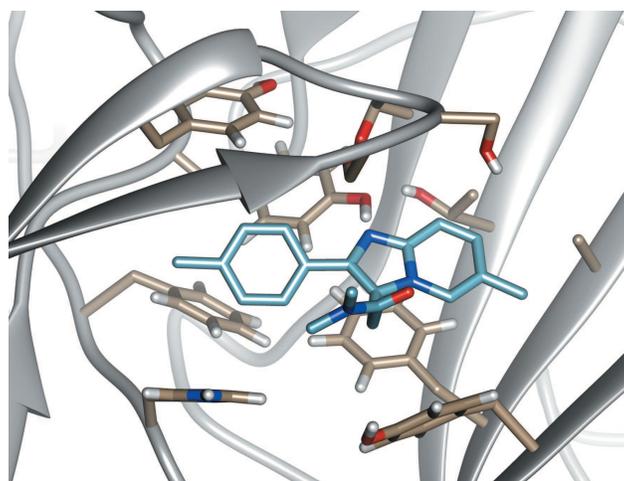


Figura 4.34: Complejo receptor-zolpidem obtenido a partir de la DM de la estructura provista por HADDOCK.

Eszopiclona

El mejor modo de unión de eszopiclona (Figura 5.1) posee altos índices de *precisión* y *sensibilidad* (Tabla 4.5). Así mismo está de acuerdo con el modelo propuesto en el farmacóforo [259] y la orientación es similar a aquella adoptada por su enantiómero R-zopiclona unido al receptor procariótico ELIC [267] (PDB ID: 4A97). Dichos ligandos comparten interacciones comunes con residuos aromáticos conservados, si bien la disposición espacial de las cadenas laterales no está exactamente preservada. El átomo de cloruro está orientado hacia la parte posterior de la cavidad, entre α_1 Tyr160 y α_1 Tyr210, y el grupo metil-piperazina se encuentra cercano a α_1 His102 y α_1 Phe100, mientras que el anillo piridina interactúa con γ_2 Phe77 y α_1 Thr207. El anillo pirrol-pirazina se ubica debajo del extremo del loop C y sobre γ_2 Tyr58. El carbonilo libre interactúa con γ_2 Tyr58 a través de un puente de hidrógeno. Un modo similar al propuesto por Hanson *et. al.* [106] se encontró con ADV con el mismo puntaje.

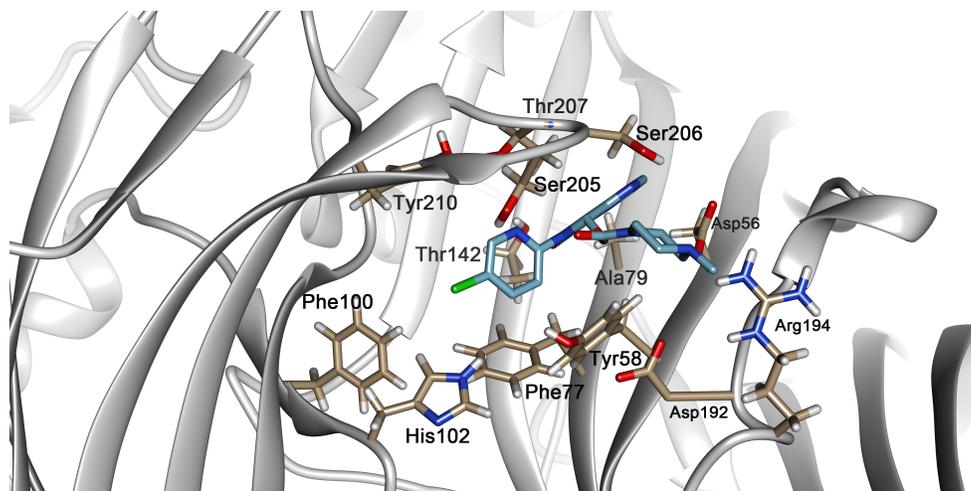


Figura 4.35: Modo de unión de eszopiclona obtenido a partir del docking con ADV.

Eszopiclona se mantuvo unida a lo largo de la simulación de DM, explorando otras conformaciones ligeramente distintas. Al igual que para otros de los sistemas, la DM aumentó el índice de *precisión*; sin embargo, el índice de *sensibilidad* disminuyó. En esta pose establece puentes de hidrógeno con α_1 Tyr160 y α_1 Ser205, e interacciones hidrofóbicas con α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Gly158, α_1 Ser159, α_1 Val203, α_1 Tyr210 α_1 Val212, γ_2 Tyr58, γ_2 Phe77, γ_2 Ala79 y γ_2 Thr142 (Figura 4.36).

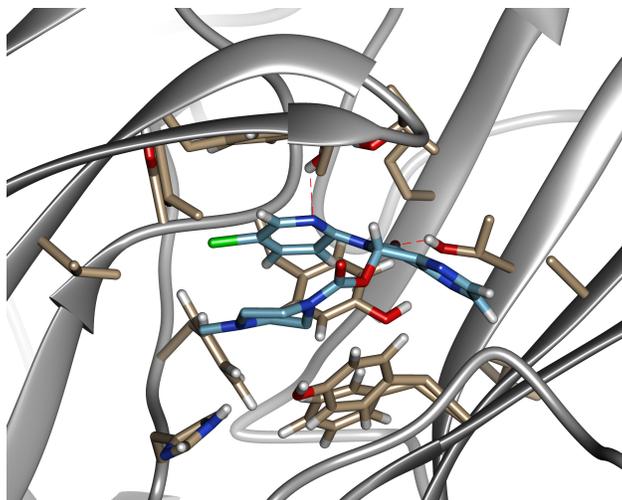


Figura 4.36: Complejo receptor-eszopiclona obtenido a partir de la DM de la estructura provista por HADDOCK.

4.3.3. Cálculo de la energía libre de unión

Se realizaron simulaciones empleando el método ABF para diazepam, zolpidem y flumazenil en complejo con el receptor GABA_A $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. Se eligieron estos tres complejos ya que se conoce el valor experimental de la energía libre de unión. Para los dos primeros ligandos se emplearon como configuraciones iniciales los mejores complejos obtenidos mediante docking molecular. Flumazenil, en cambio, se simuló en dos complejos: el obtenido a partir del docking con ADV de flumazenil en su conformación M y el complejo experimental (PDB ID: 6D6U).

Las simulaciones mediante ABF permitieron la evaluación de la energía libre de interacción entre el ligando y el receptor. De cada simulación se obtuvo información sobre la trayectoria, las muestras tomadas en cada punto, el valor del gradiente de la energía libre y el potencial de fuerza media. El gradiente de energía libre es, en este contexto, la fuerza en función de la coordenada de reacción, la cual se integra para obtener los perfiles de energía de unión (Figura 4.37).

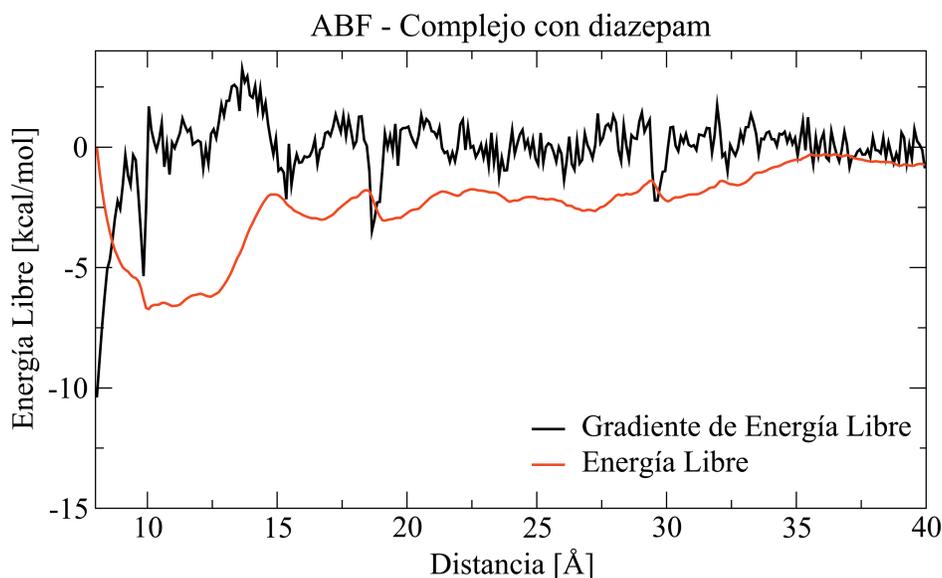


Figura 4.37: En el cálculo mediante el método ABF, el programa devuelve como resultado la fuerza media (líneas negras). Estos valores son integrados para obtener el potencial de fuerza media que equivale, en este contexto, a la energía libre (líneas rojas). Como ejemplo se muestra el resultado para 20 ns del complejo receptor-diazepam.

El tiempo de simulación fue de 20 ns por ventana, para que el ligando consiga explorar diferentes conformaciones hasta alcanzar un muestreo suficientemente homogéneo. Cerca del punto de equilibrio fue necesario subdividir las ventanas para lograr un mejor muestreo.

La cantidad de ventanas dependió principalmente de alcanzar distancias para las cuales la energía de interacción no-ligada entre el receptor y el ligando se anulasen (Figura 4.38). En todos los casos se incorporaron ventanas en las simulaciones de 15 o 20 ns para alcanzar dicho estado.

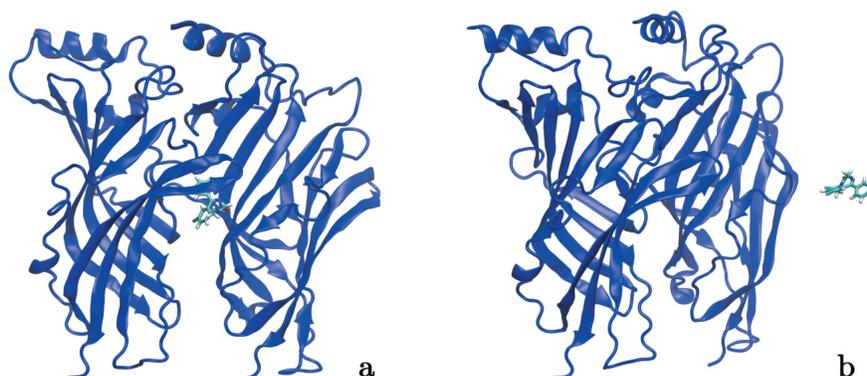


Figura 4.38: a. Configuración inicial del receptor en complejo con diazepam. b. Conformación obtenida de la simulación de la ventana que representa la distancia entre moléculas variando entre 38 y 40Å

A partir del perfil de energía libre, se pudo obtener la energía libre de unión calculando la diferencia entre el mínimo y el valor para el cual el ligando ya no interactúa con la proteína. En la tabla 4.8 se comparan los valores obtenidos para la energía libre de interacción a partir de este método y los valores encontrados en la bibliografía.

Tabla 4.8: Energía libre de interacción para los ligandos estudiados.

Ligando	ΔG_{exp} [kcal/mol]	ΔG_{ABF} [kcal/mol]
Diazepam	$-11,0 \pm 1,0$	$-6,4 \pm 1,8$
Zolpidem	$-9,9 \pm 0,4$	$-3,1 \pm 0,4$
Flumazenil	$-11,8 \pm 0,2$	$-9,2 \pm 1,6$ † $-11,3 \pm 0,6$ ‡

† a partir del docking con ADV en la conformación M
‡ estructura experimental.

La energía libre de unión de diazepam calculada *in silico* es $\Delta G_{\text{ABF}} = -6,4 \pm 1,8$ kcal/mol (Fig. 4.39). Este valor difiere notablemente de los obtenidos experimentalmente que son cercanos a $\Delta G_{\text{exp}} \approx -11$ kcal/mol [271, 272]. Como se puede observar del perfil de energía libre, existen otros mínimos locales en el camino de salida del ligando. El mínimo corresponde a una distancia entre los centros de masa de las moléculas $D = 10,05 \pm 0,10$ Å.

ABF - Complejo receptor GABA_A y Diazepam

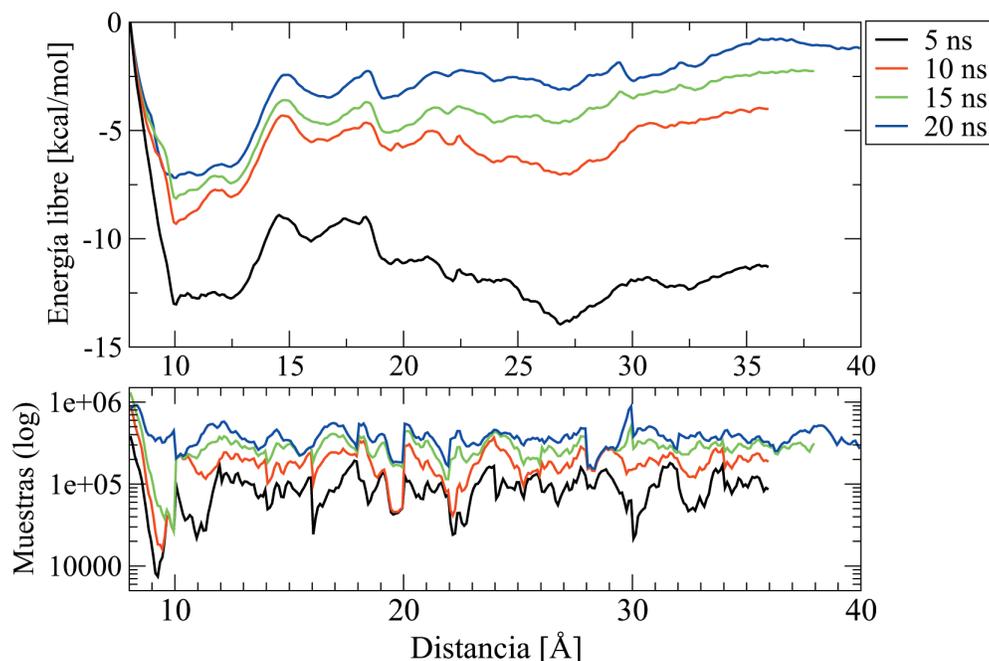


Figura 4.39: Arriba: comparación de los perfiles de energía libre para los distintos tiempos simulados. Abajo: gráfico de muestreo a lo largo de las simulaciones de ABF. El muestreo debe ser uniforme y suficientemente grande para poder asumir que, en este límite, la energía libre es igual al potencial de fuerza media calculado.

En cuanto a zolpidem, se simularon también 20 ns para cada ventana, obteniendo una energía libre de $\Delta G_{\text{ABF}} = -3,1 \pm 0,4$ kcal/mol (Figura 4.40). El valor hallado es muy inferior a los valores experimentales. Evidentemente, a pesar de que la pose encontrada con el docking tuviese altos índices de *precisión* y *sensibilidad*, la misma no refleja completamente una situación real. Los métodos de cálculo de la energía libre mediante muestreo avanzado son muy sensibles a la configuración inicial de los complejos, a la parametrización del ligando y al estado de protonación de los residuos.

El mínimo corresponde a una distancia entre los centros de masa de $D = 11,45 \pm 0,10$ Å.

AFB - Complejo receptor GABA_A y Zolpidem

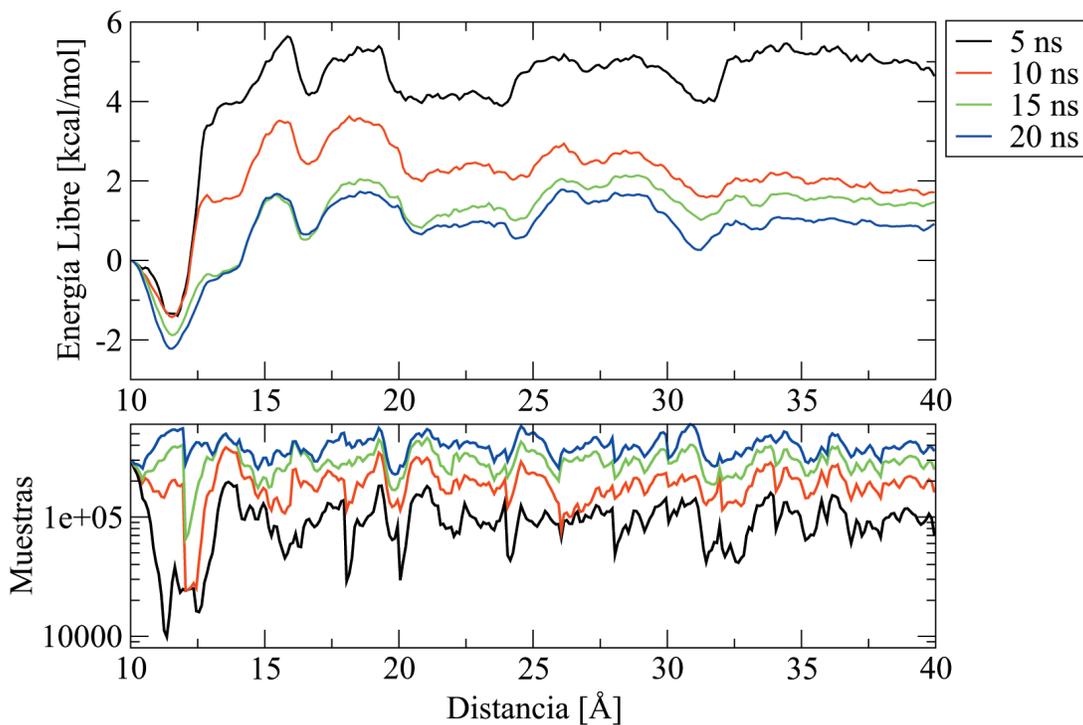


Figura 4.40: Arriba: perfiles de energía libre para el complejo formado por el receptor y zolpidem. Abajo: muestreo realizado en cada una de las simulaciones.

Se simuló el complejo de flumazenil (conformación M) con el receptor encontrado mediante ADV. El valor obtenido para la energía libre de unión fue de $\Delta G_{\text{ABF}} = -9,2 \pm 1,6$ kcal/mol (Figura 4.41). Este resultado se acercó al valor experimental propuesto, indicando una mejora sustancial en la conformación de partida respecto de los otros ligandos. La distancia en la cual se obtiene un mínimo energético es $D = 8,25 \pm 0,10$ Å.

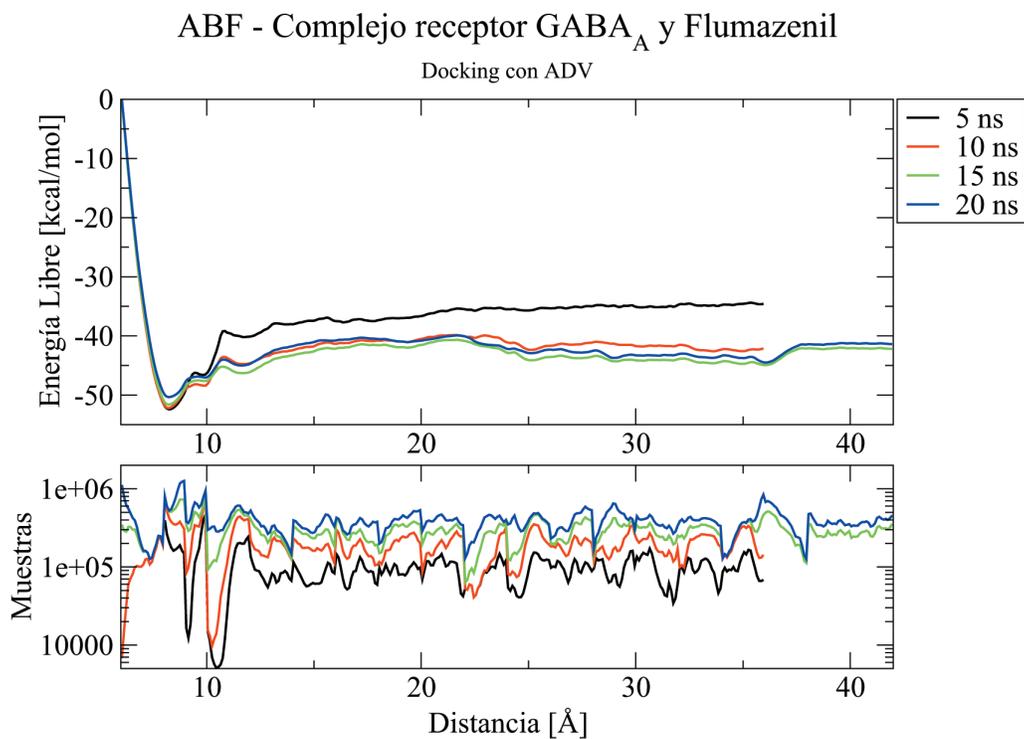


Figura 4.41: Arriba: perfiles de energía libre para el complejo formado por el receptor y flumazenil. Abajo: muestreo realizado en cada una de las simulaciones.

Por último, se comprobó el método mediante el cálculo de la energía libre de unión del complejo flumazenil-receptor obtenido mediante criomicroscopía electrónica. En este caso la estimación fue muy buena: $\Delta G_{ABF} = -11,3 \pm 0,6$ kcal/mol (Figura 4.42), con mínimo en $D = 7,65 \pm 0,10$ Å.

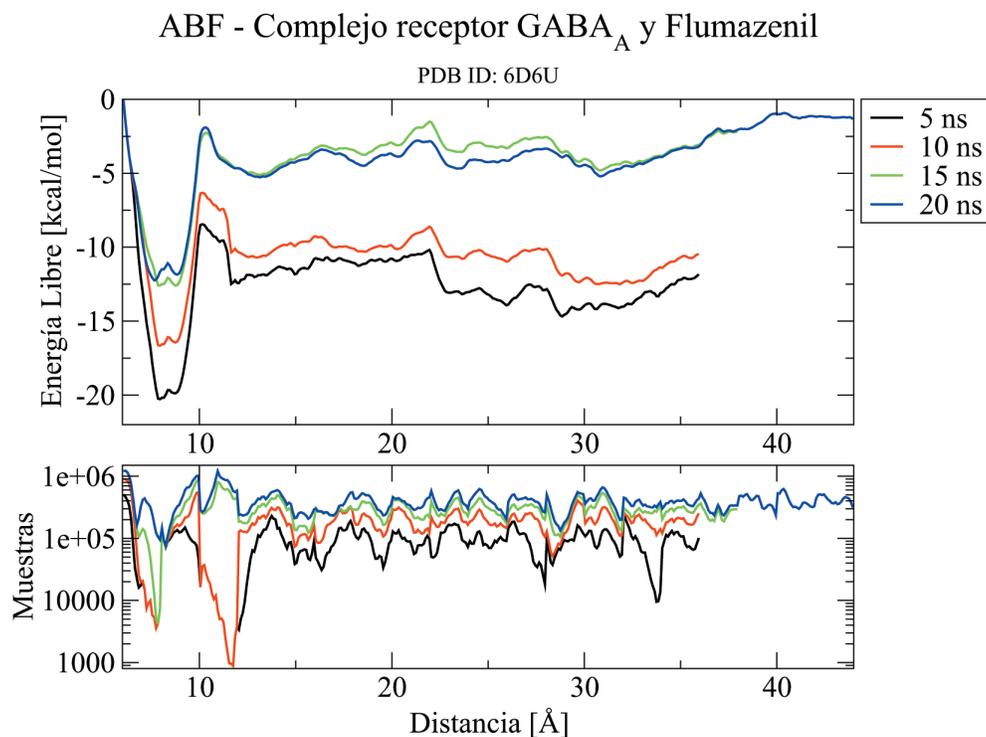


Figura 4.42: Arriba: perfiles de energía libre para el complejo formado por el receptor y flumazenil. Abajo: muestreo realizado en cada una de las simulaciones.

La energía libre de unión fue estimada para los complejos elegidos, encontrando distintos grados de concordancia con los datos experimentales. Este método es altamente dependiente de la conformación y orientación inicial, así como también de la coordenada de reacción elegida. El valor predicho para flumazenil está de acuerdo en ambos casos, con los datos experimentales, mostrando que el protocolo y la variable colectiva elegida son adecuados para el problema en cuestión. Las discrepancias observadas para los otros ligandos se explican por una configuración inicial que no es la adecuada, producto de las incertezas asociadas al modo de unión obtenido mediante docking en un modelo por homología.

4.4. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de este capítulo, se propone que el modelo presentado reproduce correctamente los sitios de unión. Mediante Docking Molecular fue posible hallar modos de unión para compuestos farmacológicamente relevantes que se unen a las cavidades de las benzodiazepinas y ortostéricas. Los modos obtenidos mediante docking

molecular fueron contrastados con datos experimentales y sometidos a un análisis dinámico mediante simulaciones de dinámica molecular. Se encontró para cada ligando, al menos una configuración que puede relacionarse con la información experimental disponible. Por lo tanto, se concluye que este modelo puede ser empleado en estudios futuros que se enfoquen en estos sitios de unión.

Sitio de unión ortostérico

Los resultados de las simulaciones de docking molecular fueron similares en el caso de los agonistas. Ambos programas presentaron modos de unión con índices altos de *precisión* y *sensibilidad*. Las poses halladas para GABA y muscimol son similares entre si y ambas se asemejan a modelos previos. En los resultados del docking los grupos cargados interactúan con β_2 Tyr97, β_2 Glu155 y α_1 Arg67. Estos residuos han sido predichos como los principales puntos de unión de los agonistas. También se destaca la presencia de β_2 Ser156, β_2 Phe200, β_2 Thr202 y α_1 Phe65.

En cuanto al modo de unión de GABA, se destacó la participación de la β_2 Arg207, que establece interacciones tanto con β_2 Glu153 y β_2 Glu155, como con el loop F de las subunidad α_1 . Un estudio del acercamiento de el loop F a la cara principal del sitio de unión a través de β_2 Arg207 y α_1 Asp184 podría dar indicios sobre un mecanismo de transmisión de la señal de unión de agonistas. Por su parte, se concluye en este trabajo que si bien el aminoácido α_1 Arg67 no es fundamental para la estabilidad del ligando, lo cual no implica que no sea fundamental desde una perspectiva funcional, una modificación de su rotámero causa el desacople de GABA.

Sin embargo, no fue posible proponer un modo de unión estable para los antagonistas, bicuculina y gabazine, si bien las poses del docking fueron concordantes con la información experimental. La causa radicaría en su mayor tamaño (respecto de GABA y muscimol) y a que el receptor fue modelado a partir de una estructura con un agonista pequeño unido a las cavidades del ECD, y por lo tanto con el loop C cerrado. Por otra parte, se detectaron posibles interacciones con residuos de la subunidad complementaria α_1 Phe46, α_1 Val47 y α_1 Thr48 que no han sido reportados aún en la bibliografía. Sería importante, para una mejor caracterización de la interacción de estos ligandos, realizar estudios experimentales

que evalúen la influencia de dichos aminoácidos.

A partir del RMSD se observó que los agonistas se mantuvieron estables en el sitio de unión a lo largo de la simulación de DM, mientras que los antagonistas exploran diversas conformaciones y orientaciones dentro del sitio de unión. Esto es compatible con la propuesta que los modos de unión encontrados para los agonistas son factibles, mientras que para los antagonistas, por poseer mayor tamaño no logran acomodarse en el sitio de unión tal como está modelado.

Sitio de unión de gran afinidad de las benzodiazepinas

La información actual sobre la cavidad de las benzodiazepinas permitió, a través de diferentes protocolos de docking molecular, proponer un modo de unión para las benzodiazepinas clásicas, como diazepam. En las simulaciones de dinámica molecular diazepam modifica su orientación inicial y se acomoda de forma semejante en los tres complejos resultantes. Se destacó la interacción con los aminoácidos α_1 Phe100, α_1 His102, α_1 Ser205, α_1 Tyr160, α_1 Tyr210, γ_2 Tyr58, γ_2 Asn60 y γ_2 Phe77, todos ellos propuestos por estudios experimentales previos. De las simulaciones de dinámica molecular se destacó también la rotación diferenciada de la subunidad γ_2 en uno de los casos, movimiento que podría estar relacionado con el mecanismo de señalización del ligando.

En cuanto al resto de las benzodiazepinas clásicas, la pose de flurazepam, si bien es muy móvil a lo largo de la simulación de DM, resulta similar a la adoptada por el bromoflurazepam en la estructura cristalográfica de ELIC [267]. Los residuos destacados para flurazepam, flunitrazepam y clonazepam son compartidas con diazepam. En este contexto, la pose de flunitrazepam, que se diferencia del resto de las benzodiazepinas clásicas por ubicar el anillo fenil en el exterior de la cavidad, probó que es posible un modo de unión alternativo. Este ha sido propuesto en el pasado en estudios *in silico* [266].

Los modos de unión para las i-BZDs también pudieron ser hallados, mostrando que, en el modelo, esta cavidad es capaz de unir no sólo moduladores positivos, sino también antagonistas y moduladores alostéricos negativos. Además, resulta destacable que mediante la comparación de los modos de unión propuestos para ambos ligandos y a partir del análisis de estabilidad de las DM, se pudo predecir correctamente la orientación correcta de flumazenil

en el sitio de unión. Esta pose fue luego corroborada con la estructura del receptor PDB ID: 6D6U. Las simulaciones de los complejos con ro15-4513 muestran que el aminoácido γ_2 Arg97 forma una interacción importante con el ligando, por lo tanto se propone su estudio mediante técnicas experimentales.

Por otro lado, los ligandos zolpidem y eszopiclona exhibieron modos de unión que están de acuerdo con modelos previos y datos experimentales. Los resultados para zolpidem presentan mayor ambigüedad que el resto de los ligandos por dos motivos; al ser estructuralmente muy distinto no se pueden establecer analogías con los modos de unión del resto de los ligandos y además los contactos que mantiene son principalmente hidrofóbicos, y por lo tanto podría adoptar una gran variedad de orientaciones dentro de la cavidad, en especial dentro de la *caja aromática*. En cuanto a eszopiclona, el modo de unión aquí propuesto se corresponde con el adoptado por su enantiómero R-zopiclona al unirse al receptor ELIC [267].

Es importante destacar que todos los ligandos de la cavidad de las benzodiazepinas se mantuvieron en su sitio de unión, validando la estabilidad de los modos de unión propuestos a partir del docking.

La conformación de las benzodiazepinas es determinante para encontrar el modo de unión correcto. Luego de analizar las diferencias entre los complejos con flumazenil, resulta claro que la conformación M es más favorable que la P, esto está en concordancia con información experimental [273–275]. Se encontró que las conformaciones de los ligandos obtenidas a partir de la minimización no siempre respetan esta conformación. Por lo tanto, esta es una fuente de error en ligandos como clonazepam y flunitrazepam.

A partir de la contrastación con los resultados de la estructura experimental PDB ID:6D6U se infirió que la correcta orientación de la cadena lateral de la α_1 His102 es fundamental para la unión de ciertos ligandos. No sólo se pone en evidencia en los cálculos de energía libre, sino que además, a lo largo de las tres simulaciones de DM del complejo con diazepam, flurazepam y flumazenil, la cadena lateral de la histidina se acomoda como se muestra en la estructura experimental. En contraposición, se desprendió de las simulaciones de ro15-4513 que este rotámero no tiene influencia en la unión de este ligando.

Cálculo de energía libre

A partir de este trabajo se pudo estimar computacionalmente la energía libre de interacción entre receptor GABA_A y ligandos del sitio de unión de las benzodiazepinas. Si bien los resultados para diazepam y zolpidem difieren de las cifras obtenidas experimentalmente, estos se encuentran dentro de los valores esperados considerando en primer lugar que se parte de una estructura del receptor obtenida mediante modelado por homología y que las posiciones iniciales de los ligandos fueron obtenidas mediante técnicas computacionales (docking molecular). Por otro lado, cabe destacar que los resultados experimentales presentados en la literatura son también variables [276, 277].

Por su parte, la energía libre de unión de flumazenil pudo ser muy bien estimada en ambas simulaciones, en particular para la del complejo experimental. Esto indicaría que la variable colectiva elegida y las condiciones de simulación son adecuadas para el tipo de sistema y análisis realizado.

Desafíos

La principal desventaja al contrastar datos experimentales con resultados obtenidos del docking molecular proviene del hecho que, generalmente, los primeros no proveen información precisa sobre las interacciones entre los ligandos y los aminoácidos. A través de estudios de mutación, *photolabelling*, sustitución de cisteínas, etcétera, se detectan los residuos que participan, de alguna forma, de la interacción o son parte del sitio de unión; sin embargo, esto no significa necesariamente que están interactuando en forma directa con los compuestos; ellos podrían estar afectando la forma de la cavidad o formando redes de interacción con aminoácidos que deberían estar en contacto con los ligandos. A pesar de ser una fuente valiosa de información sobre la relación estructura-función de los receptores, los resultados de estudios de mutagénesis dirigida presentes en la literatura suelen no contemplar las posibles modificaciones alostéricas estructurales al postular la importancia de un determinado residuo en la unión.

Si bien las simulaciones de dinámica molecular empleadas abarcan tiempos del orden de los 100 ns y permiten analizar la estabilidad del mismo, así como el re-acomodamiento

de cadenas laterales generada por la presencia de los ligandos, esta escala de tiempo es insuficiente para analizar los cambios conformacionales globales inducidos en el receptor por la unión de los ligandos. Por lo tanto, no es posible formular hipótesis referidas a la funcionalidad del receptor y apertura del canal.

Capítulo 5

Parte III - Interacción del receptor GABA_A con la proteína DBI y sus fragmentos peptídicos

5.1. Objetivos

- Estudiar si es factible la interacción entre el receptor GABA_A del subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ con la proteína DBI y los péptidos derivados de su digestión trípica.
- Identificar los aminoácidos involucrados en las interacciones con DBI y sus fragmentos peptídicos.
- Analizar la posibilidad de unión de diazepam a la proteína DBI.

5.2. Métodos

La metodología aplicada es similar a la empleada en los capítulos previos para el análisis de la unión de ligandos pequeños, sin embargo presenta ciertas diferencias que serán aclaradas posteriormente.

En la actualidad existe escasa información experimental sobre la interacción entre estas proteínas, a pesar de ser un sistema de gran interés para la salud humana. Con el objetivo

de superar esta dificultad, se subdividió el estudio en cuatro secciones, permitiendo analizar progresivamente la interacción con fragmentos peptídicos de mayor tamaño hasta la proteína completa.

Los métodos empleados para este estudio incluyen simulaciones de docking molecular y de dinámica molecular. Se empleó para todos los cálculos la estructura de ACBP de humano PDB ID: 2FJ9, obtenida con una resolución de 1,6 Å en estado APO (sin ligando) [114].

Se utilizó el programa HADDOCK a través de su servidor web, ya que se encuentra especialmente preparado para el docking proteína-proteína. Se utilizó la interfaz Gurú dejando todos los valores por defecto. Luego se empleó el servidor web FlexPepDock [278, 279], que refina complejos proteína-péptido, para mejorar las conformaciones obtenidas.

Se realizaron distintas simulaciones de dinámica molecular *all atom* con solvente explícito. Por un lado se simularon ODN y los fragmentos peptídicos menores en un entorno acuoso para obtener las posibles conformaciones que adoptan estos péptidos cuando no forman parte de la proteína. Por otro lado se realizaron simulaciones del receptor GABA_A embebido en una membrana de POPC, en complejo con DBI, ODN y los péptidos más pequeños. Por último se analizó la dinámica molecular de la proteína DBI junto con moléculas de diazepam.

En general, el protocolo seguido es el mismo que el descrito en el capítulo 3.2.3 y las condiciones de simulación fueron iguales. Las simulaciones que no involucran al receptor se diferencian por el empleo de cajas dodecaédricas, para optimizar el sistema, y el proceso de equilibrado realizado en el ensamble NVT ya que no hay membrana presente.

5.2.1. Interacción con fragmentos peptídicos derivados de ODN

Se analizaron 12 péptidos derivados de DBI: Asn41-Thr51, -Gly52 y -Lys53, Thr42-Thr51, -Gly52 y -Lys53, Glu43-Thr51, -Gly52 y -Lys53 y Arg44-Thr51, -Gly52 y -Lys53. Se eligieron los distintos péptidos como variaciones del OP propuesto en la literatura, ya que en humano difiere en longitud respecto del de rata. El objetivo que impulsa la elección de los distintos fragmentos es la búsqueda de patrones de interacción.

El protocolo consistió en recortar cada uno de los péptidos de la estructura de PDB ID: 2FJ9 (ACBP de humano), minimizar y simular cada fragmento peptídico por 50ns, *clusterizar* la trayectoria para obtener conformaciones estadísticamente relevantes, realizar

Secuencia ODN humano

34QATVGDINTERPGMLDFTGK53
OP

Figura 5.1: A partir de la secuencia de ODN se seleccionaron 12 péptidos de longitudes de entre 13 y 10 residuos. En violeta está subrayado el péptido OP y en verde los residuos adicionales que se estudiaron debido a que están muy conservados en las secuencias de las distintas especies.

una simulación de docking molecular con HADDOCK, refinar los complejos con FlexPepDock y analizar los complejos obtenidos en ambos estadios (pre- y post-refinamiento) con los servidores web Prodigy (PROtein binDing enerGY prediction) [280] y HyPPI [281].

En todos los casos se fijó como residuo activo de la proteína la α_1 His102, y todos los residuos de los péptidos se definieron como activos para estos. Se extrajeron de HADDOCK los complejos con mejor puntaje general, con mejor puntaje y perteneciente a algún *cluster*, y el mejor modelo del *cluster* más numeroso.

Primeramente se analizaron los contactos comunes para los mejores modelos correspondientes a cada uno de los péptidos. A continuación, se simuló mediante DM el complejo que presenta los mejores puntajes.

5.2.2. Interacción ODN - receptor GABA_A

Se realizaron simulaciones de DM del péptido ODN en una solución de agua e iones al 0,15 M con el objetivo de observar el comportamiento y la estructura de este fragmento cuando es separado de la proteína completa. Se *clusterizó* la dinámica de producción (método *linkage* y valor de corte 0,1 nm) y se eligió la estructura representativa del *cluster* mayor para seguir con el docking. A continuación se realizó el docking de ODN con HADDOCK en el modelo confeccionado en este trabajo.

Paralelamente se realizó el docking de ODN extraído directamente de la proteína, sin minimizar, mediante HADDOCK. Finalmente, se seleccionó un complejo para simular mediante DM, tomando en consideración los puntajes de los servidores Prodigy y HyPPI, y las interacciones presentes en cada uno de los complejos obtenidos anteriormente.

5.2.3. Interacción DBI - receptor GABA_A

Se descargaron las estructuras de DBI resueltas mediante difracción de rayos X del PDB (Tabla 5.1 y se analizaron los posibles modos de unión de ellas con el receptor modelado. Se emplearon para el docking molecular guiado las siguientes condiciones: α_1 His102 como residuo activo y aquellos circundantes como residuos pasivos para el receptor. El residuo activo en DBI fue Glu43 y nuevamente los residuos pasivos fueron aquellos lindantes. A partir de las estructuras obtenidas se realizaron simulaciones de dinámica molecular.

Tabla 5.1: Estructuras de ACBP/DBI empleadas en este trabajo.

PDB ID	Característica
2FJ9	ACBP de hígado de humano, sin ligando
2CB8	ACBP de hígado de humano, con ligando
1HB8	ACBP bovina
2FDQ	ACBP armadillo de glándula de Harder

Se llevaron a cabo tres simulaciones de DM a partir de los dos mejores complejos según HADDOCK: del Complejo 1 correspondiente al modelo de menor energía, del Complejo 2 correspondiente al complejo con la segunda menor energía, y del complejo tal que DBI estaba orientado según el Complejo 2 pero ubicado a una distancia de $\sim 1,5$ nm del receptor. Se simularon los tres sistemas ya que el segundo *mejor* complejo, según el puntaje de HADDOCK, es similar a los complejos más favorables hallados para las otras estructuras de DBI.

5.2.4. Interacción DBI - Diazepam

A pesar de no contar con información experimental acerca una posible interacción entre DBI y diazepam, tras la observación de que DBI puede ser sustrato de distintos ligandos, se hipotetizó una posible interacción entre dicha proteína y diazepam como un mecanismo alternativo de inhibición. En primer lugar se realizó un estudio de docking molecular mediante Autodock Vina, empleando como posible región de unión un cubo de 2,5 nm de lado (que encierra a toda la proteína). La posición de menor energía muestra a diazepam en el sitio

de unión de los ácidos grasos. En segundo lugar, se realizó una dinámica molecular de este sistema de 220 ns, para analizar su estabilidad.

Se realizó una simulación de DM con cinco moléculas de diazepam dispuestas aleatoriamente alrededor de DBI para evaluar la posibilidad de que diazepam se una al sitio espontáneamente, independientemente de su estabilidad dentro del mismo.

5.3. Resultados

5.3.1. Interacción con fragmentos peptídicos derivados de ODN

Como tendencia general los resultados del análisis con Prodigy y HyPPI, fueron mejores para los complejos sin refinar con FlexPepDock, por lo tanto son estos los que se detallan a continuación (Tabla 5.2). HyPPI no reconoció a ningún complejo como permanente y sólo unos pocos mostraron una probabilidad mayor al 50 % de ser transitivos, siendo este el estado esperado. Thr45-Thr51, Glu43-Gly52, Arg44-Gly52 y Arg44-Lys53 fueron identificados como transitivos. Arg44-Lys53 (OP) posee la menor probabilidad de ser un artefacto, en concordancia con los resultados experimentales que proponen la interacción de este péptido con el receptor GABA_A [121].

Tabla 5.2: Los mejores modelos de acuerdo al análisis de interacciones realizado mediante servidores web Prodigy y HyPPI.

Péptido	ΔG (Prodigy) [kcal/mol]	HyPPI - %Probabilidad de complejo permanente	HyPPI - %Probabilidad de complejo transitivo	HyPPI - %Probabilidad de artefacto
Asn41-Thr51	-8,7	1	29	71
Asn41-Gly52	-9,8	2	48	50
Asn41-Lys53	-9,0	1	46	53
Thr42-Thr51	-8,6	2	52	46
Thr42-Gly52	-9,5	1	35	65
Thr42-Lys53	-10,4	1	47	51
Glu43-Thr51	-9,3	0	24	76
Glu43-Gly52	-10,7	3	60	37
Glu43-Lys53	-8,7	1	37	62
Arg44-Thr51	-8,8	2	48	50
Arg44-Gly52	-8,7	2	52	46
Arg44-Lys53	-9,7	4	63	34
Arg44-Lys53 (c-EM)	-9,7	4	65	31

Luego de un minucioso análisis de las interacciones presentes en cada uno de los complejos (Tablas 5.3 y 5.4) no se pudo extraer un patrón de interacciones comunes. En cada complejo, los péptidos logran acomodarse en la cavidad adoptando posiciones y orientaciones distintas.

Con el objetivo de corroborar el modo de unión encontrado para OP se lo simuló interactuando con la estructura experimental. Si bien los puntajes fueron similares a los obtenidos para el receptor modelado, el modo de unión es claramente distinto.

Tabla 5.3: Puentes de hidrógeno establecidos en los complejos formados por péptidos de diferente longitud y el receptor GABA_A.

Thr41-Thr51		Thr41-Lys53		Glu43-Gly52		Arg44-Gly52	
Receptor	Péptido	Receptor	Péptido	Receptor	Péptido	Receptor	Péptido
α_1 Lys156	Thr42	α_1 Lys156	Glu43	α_1 His102	Glu43	α_1 Val203	Arg44
α_1 Lys156	Glu43	α_1 Lys156	Asp49	α_1 Glu138	Thr51	α_1 Thr207	Arg44
γ_2 Ile62	Asp49	γ_2 Asp192	Leu48	α_1 Glu138	Gly52	γ_2 Ser61	Asp49
γ_2 Asp192	Leu48			α_1 Lys156	Asp49	γ_2 Arg197	Asp49
γ_2 Arg197	Asp49			γ_2 Val59	Glu43	γ_2 Arg197	Thr51
				γ_2 Arg197	Leu48	γ_2 Tyr199	Thr51
				γ_2 Arg197	Phe50		
				γ_2 Arg197	Gly52		

Tabla 5.4: Puentes de hidrógeno establecidos en los complejos entre el péptido OP y el receptor GABA_A.

Arg44-Lys53 (modelo)		Arg44-Lys53 (DM)		Arg44-Lys53 (c-EM)	
Receptor	Péptido	Receptor	Péptido	Receptor	Péptido
α_1 Tyr160	Lys53	α_1 His102	Asp49	α_1 Ala161	Lys53
α_1 Ser205	Phe50	α_1 His102	Thr51	α_1 Thr163	Lys53
γ_2 Tyr58	Asp49	α_1 Lys156	Asp49	α_1 Glu166	Lys53
		α_1 Tyr160	Thr51	α_1 Ser205	Asp49
		α_1 Ser200	Arg44	α_1 Thr207	Gly52
		α_1 Ile202	Pro45	α_1 Tyr210	Lys53
		α_1 Ile202	Leu48	γ_2 Arg132	Gly52
		α_1 Gln203	Gly46		
		α_1 Ser205	Phe50		
		α_1 Ser205	Lys53		
		α_1 Ser206	Lys53		
		α_1 Thr207	Lys53		
		α_1 Tyr210	Lys53		
		α_1 Thr214	Met47		

La dinámica molecular de OP interactuando con el modelo del receptor GABA_A mostró que el péptido se mantuvo unido a la cavidad principalmente a través de su extremo C-terminal. Esta porción presentó poca movilidad, probablemente debido a que se mantuvo cubierto por el loop C. En cambio, el extremo N-terminal fue muy móvil y adoptó distintas posiciones rodeando a la subunidad α_1 (Figura 5.2.a). A lo largo de la simulación el complejo se estabilizó con un RMSD entre C $_{\alpha}$ que apenas supera 0,4 nm (Figura 5.2.b).

Los aminoácidos interactuantes del extremo C-terminal de los péptidos fueron los más recurrentes en los distintos sistemas. Tal es el caso de Leu48, Asp49, Phe50, Thr51 y Lys53. En particular Asp49 que en la simulación de DM interactúa mediante un puente de hidrógeno con α_1 His102. Los aminoácidos del loop C también tienen un papel activo a lo largo de la simulación al interactuar con el extremo C-terminal (Lys53) de los péptidos (Figura 5.3). La α_1 Lys156 fue detectada en los otros niveles del estudio, y también forma parte del conjunto de interacciones obtenidas en la dinámica y en los complejos con los otros péptidos.

La importancia del extremo C-terminal de los péptidos derivados de DBI fue propuesta por Berkovich *et. al.* en 1989 [282]. Ellos observaron que tanto la amidación de la lisina terminal como el corte del extremo C-terminal de los péptidos inhibe su unión a los sitios de gran afinidad de las benzodiazepinas. Propusieron que esta porción funciona como *mensajero* de la actividad biológica, mientras que el extremo N-terminal determina la especificidad por los distintos sitios de unión.

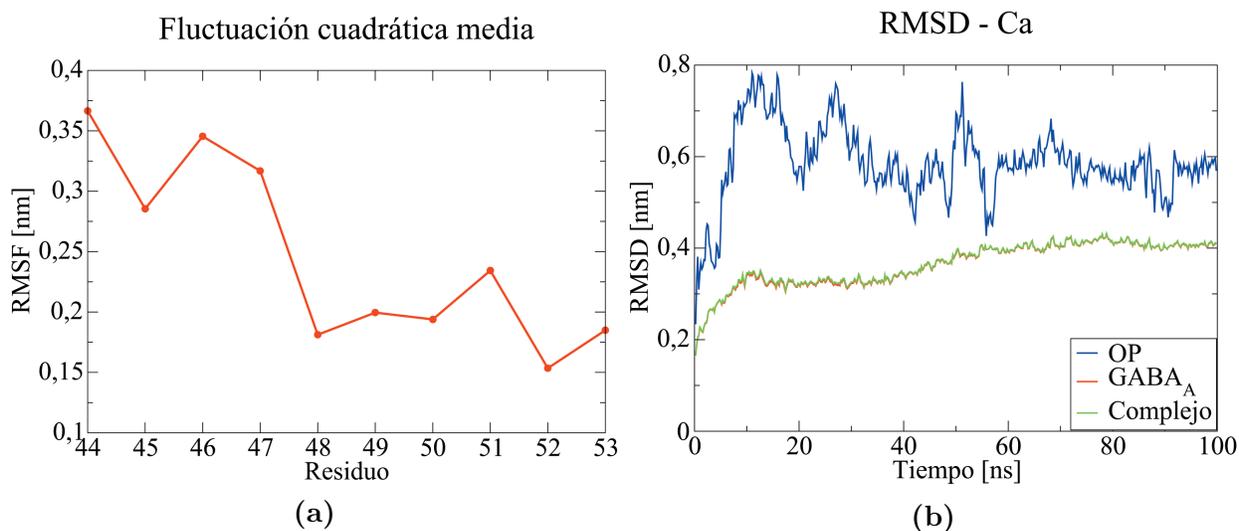


Figura 5.2: a. Fluctuación cuadrática media para los aminoácidos del péptido OP; b. desviación cuadrática media de los C $_{\alpha}$ del receptor y OP a lo largo de la simulación de DM.

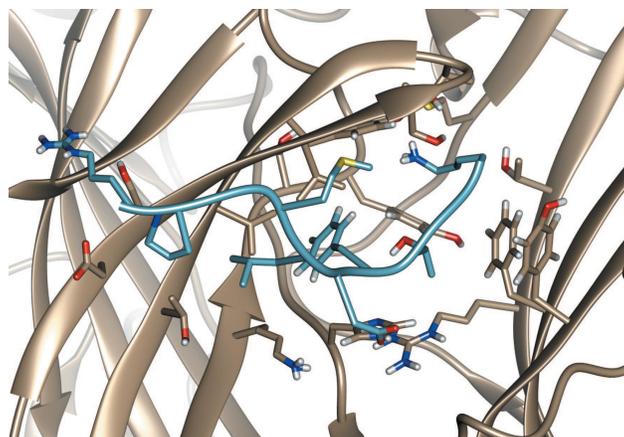


Figura 5.3: Complejo OP-receptor GABA_A obtenido de la *clusterización* de la simulación de DM

5.3.2. Interacción ODN - receptor GABA_A

En una primera instancia se simuló al péptido ODN mediante DM en solvente explícito por 100 ns para analizar su comportamiento y estructura como ente independiente. La simulación muestra que el péptido no logró estabilizarse en los primeros 100 ns (Figura 5.4.a). Adoptó conformaciones progresivamente más plegadas, logrando que los residuos hidrofóbicos se aproximaran 5.4.b).

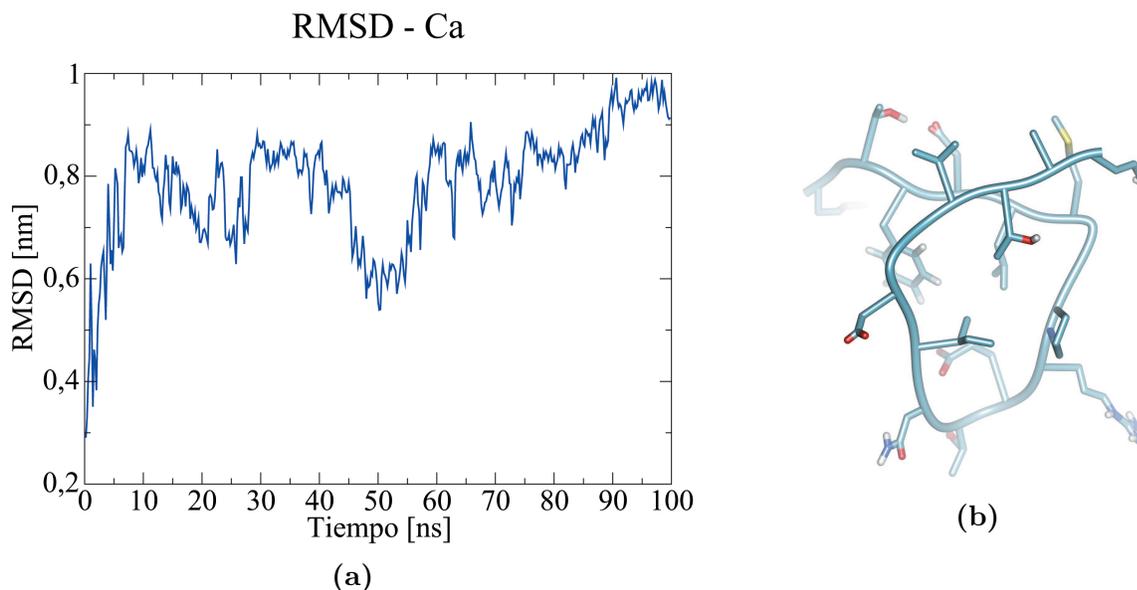


Figura 5.4: a. El RMSD muestra una gran variabilidad conformacional; b. La estructura representada se obtuvo de la *clusterización* y corresponde a los últimos nanosegundos de simulación.

En una segunda instancia, se realizaron simulaciones de docking molecular para ODN

en dos conformaciones: la primera extraída directamente de la proteína PDB ID: 2FJ9, y la segunda de la *clusterización* de la simulación de DM de dicha estructura. De los complejos encontrados, la clasificación según los servidores PRODIGY y HiPPY no concuerda (Tabla 5.5), a diferencia del análisis de los péptidos de menor longitud en el cual seguían una misma tendencia.

Tabla 5.5: Análisis mediante servidores web de los mejores modelos, de acuerdo a los puntajes de HADDOCK, para el péptido ODN sin minimizar y luego de una corta simulación de DM.

Complejo	ΔG Prodigy [kcal/mol]	HyPPI - %Probabilidad de complejo permanente	HyPPI - %Probabilidad de complejo transitivo	HyPPI - %Probabilidad de artefacto
Cluster1 (pre DM)	-9,0	1	32	68
Cluster7 (pre DM)	-9,2	2	49	49
Cluster1 (Clust DM)	-10,6	0	23	77
Cluster 4(Clust DM)	-8,0	1	37	63
Complex110 (Clust DM)	-10,7	0	25	75

Teniendo en cuenta las discrepancias entre los programas de análisis, se seleccionaron los complejos con mejores propiedades según cada uno de los servidores: *Cluster 7* (desde ahora Complejo 1) y *Complex110* (desde ahora Complejo 2). Estos modelos poseen el menor puntaje según HADDOCK y además, en ambos el extremo C terminal se encuentra dentro de la cavidad (Figuras 5.5 a. y b.) en concordancia con OP. En la Tabla 5.6 se detallan los puentes de hidrógeno a los que está sometido ODN en cada uno de los complejos.

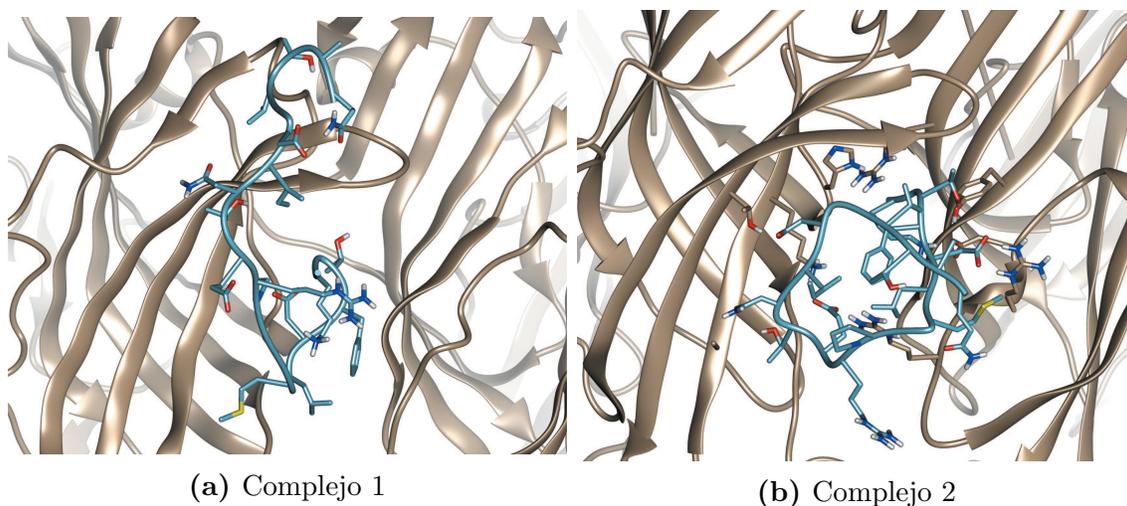


Figura 5.5: Poses propuestas para la interacción de ODN con el receptor GABA_A.

Tabla 5.6: Puentes de hidrógeno establecidos entre ODN y el receptor GABA_A en los complejos obtenidos del docking molecular.

Complejo 1		Complejo 2	
Receptor	Péptido	Receptor	Péptido
α_1 His102	Asp49	α_1 His102	Lys53
α_1 Lys156	Asp49	α_1 Ala152	Thr42
α_1 Lys156	Glu43	α_1 Lys156	Glu43
α_1 Ile202	Thr42	α_1 Lys156	Asp39
α_1 Gln203	Gln34	α_1 Thr214	Asp39
α_1 Gln204	Gly38	γ_2 Tyr58	Thr51
α_1 Glu209	Gln34	γ_2 Arg144	Lys53
α_1 Glu209	Thr36	γ_2 Asp192	Lys53
α_1 Glu209	Val37	γ_2 Arg194	Asp49
		γ_2 Arg197	Glu43

Finalmente, se seleccionó el Complejo 1 para realizar una simulación de DM. En general el complejo se mantuvo estable (Figura 5.6), mientras que el péptido, a partir de los 50 ns, presentó una gran movilidad del extremo N-terminal plasmado en los altos valores del RMSD.

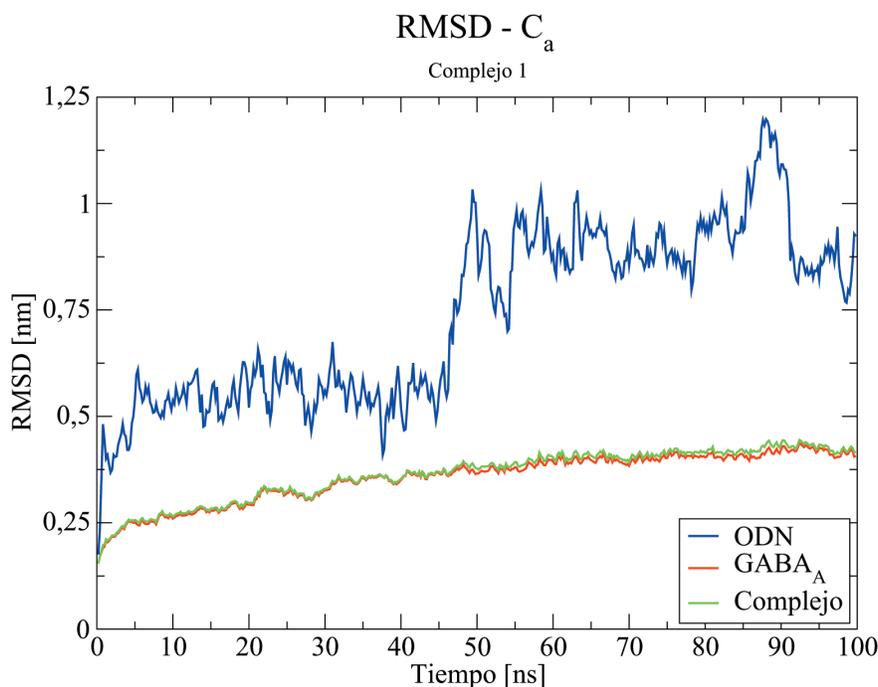


Figura 5.6: La figura presenta la desviación cuadrática media de los C_α de ODN, el receptor y el complejo, calculado realizando un ajuste sobre los C_α del complejo. El RMSD muestra que el péptido no llega a estabilizarse en la simulación y posee dos estados bien diferenciados.

El complejo obtenido de la *clusterización* corresponde a un tiempo en el cual el sistema no se había estabilizado (Figura 5.7.a). Según el webserver HyPPI este complejo tiene un 47% de probabilidad de ser transitivo, es decir que disminuyó respecto del complejo inicial. Por el contrario, los complejos de los últimos cuadros de la simulación poseen una probabilidad de ser complejos transitivos del 53% (Figura 5.7.b), indicando una mejora respecto del complejo inicial.

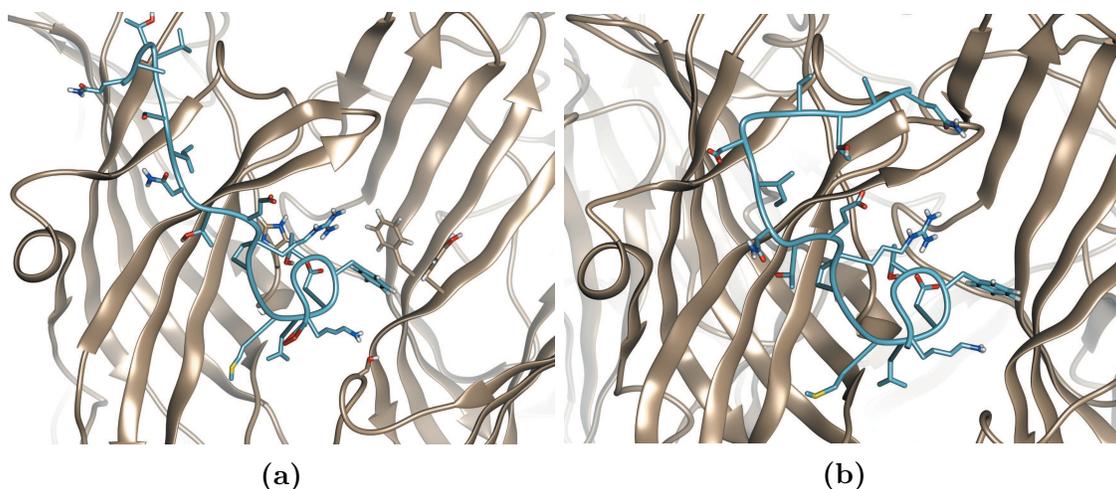


Figura 5.7: a. La estructura obtenida de la *clusterización* de la trayectoria corresponde a los 44 ns, previo al primer incremento de RMSD; b. configuración final de la simulación de DM del sistema formado por el receptor GABA_A y ODN.

A lo largo de la trayectoria, ODN estableció distintos tipos de interacción hidrofóbica, π -*stacking* y puentes de hidrógeno con residuos de las subunidades α_1 y γ_2 . Los puentes de hidrógeno con ocupancia mayor al 10 % se muestran en la Tabla 5.7. Además estableció interacciones con α_1 Lys156, α_1 Ser200, α_1 Gln203 y γ_2 Asn60.

Tabla 5.7: Puentes de hidrógeno establecidos entre ODN y el receptor GABA_A a lo largo de la simulación de DM.

Receptor	Péptido	Ocupancia
α_1 Arg164	Val37	11 %
α_1 Asp199	Thr42	25 %
α_1 Ile202	Thr42	39 %
α_1 Ile202	Arg44	26 %
α_1 Glu209	Ala35	19 %
α_1 Glu209	Thr36	19 %

5.3.3. Interacción DBI - receptor GABA_A

El docking de las distintas DBI en el receptor GABA_A dio como resultado dos modos de unión principales, correspondientes a los complejos con menor puntaje de HADDOCK del docking de la proteína PDB ID: 2FJ9 (Figuras 5.8 y 5.9). El segundo complejo es equivalente

al complejo de menor energía en las simulaciones de docking de las otras estructuras de DBI.

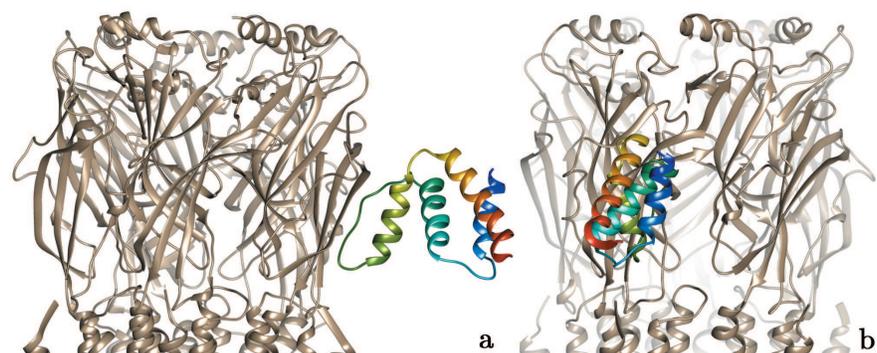


Figura 5.8: Complejo 1 (menor puntaje de HADDOCK). Presenta una probabilidad del 29% de ser un complejo transitivo (calculado con HyPPI) y un $\Delta G = -8,9$ kcal/mol según Prodigy. a. Vista lateral; b. vista frontal.

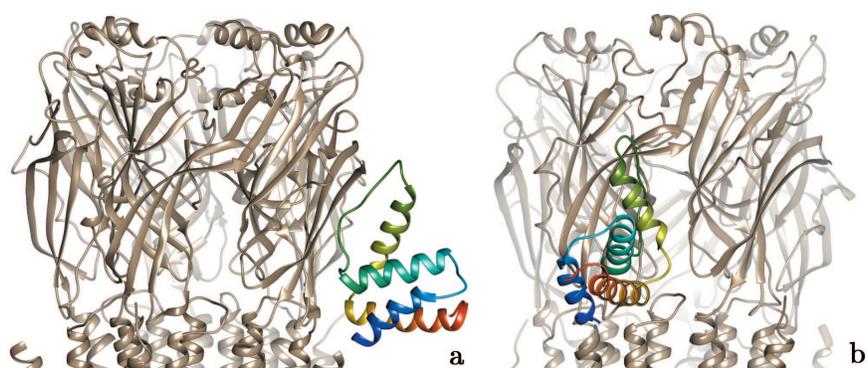


Figura 5.9: Complejo 2 (El *segundo mejor complejo* según HADDOCK). Presenta una probabilidad del 42% de ser un complejo transitivo (calculado con HyPPI) y un $\Delta G = -9,8$ kcal/mol según Prodigy. a. Vista lateral; b. vista frontal.

A lo largo de la simulación de DM del Complejo 1 DBI resultó muy móvil (Figura 5.10.a), alejándose del receptor y acercándose a la membrana. Correspondientemente, mantuvo unos pocos contactos con el receptor, todos con una ocupancia (calculado con VMD) inferior al 6%. El webservice HyPPI predijo que el complejo representativo de la simulación (Figura 5.10.b) posee sólo el 18% de probabilidad de ser transitivo, y un 82% de ser un artefacto.

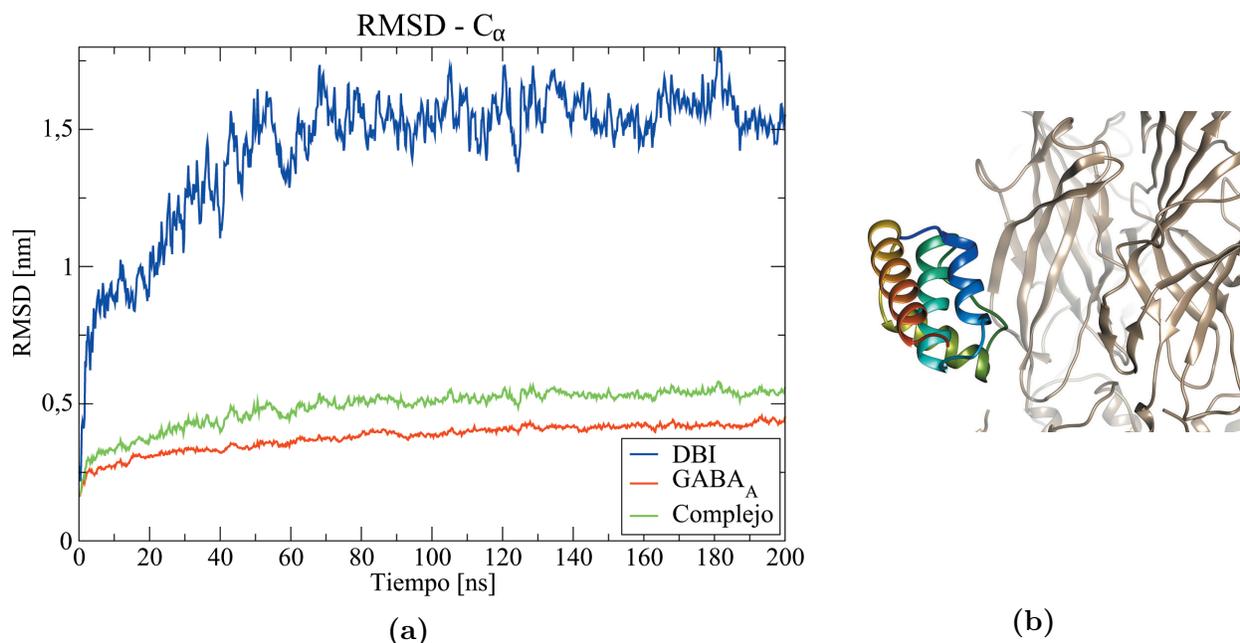


Figura 5.10: a. La figura presenta la desviación cuadrática media de los C_α de DBI, el receptor y el complejo, calculado realizando un ajuste sobre los C_α del Complejo 1; b. estructura representativa de la simulación de DM. DBI es representada en multicolor y el receptor GABA $_A$ en beige.

Se descartó esta conformación debido a los elevados valores del RMSD de DBI a lo largo de la simulación y a que los contactos que se establecieron las proteínas (Tabla 5.8) no fueron estables. Además las interacciones presentes no involucraron residuos predichos para la interacción con benzodiazepinas.

Tabla 5.8: Puentes de hidrógeno establecidos a lo largo de la simulación de DM del Complejo 1.

Receptor	Péptido	Ocupancia
α_1 Ile202	Ile40	2 %
α_1 Thr214	Glu43	2 %
α_1 His216	Glu43	6 %
α_1 His218	Glu43	2 %

Se realizaron dos simulaciones del Complejo 2, una de ellas involucró un corrimiento de la proteína alejándola del receptor. En este caso, DBI no se acercó al receptor, indicando que a mayor distancia DBI debe orientarse en forma distinta para favorecer la unión. La otra

simulación del Complejo 2 (Figura 5.11) mostró que, de lograr obtener dicha conformación, las interacciones que mantiene DBI con el receptor son estables. Si bien la proteína se movió sin alcanzar un equilibrio (Figura 5.12.a), el valor del RMSD es inferior al sufrido por el receptor, a diferencia del obtenido para el Complejo 1, en el cual el RMSD de DBI triplicaba al del receptor.

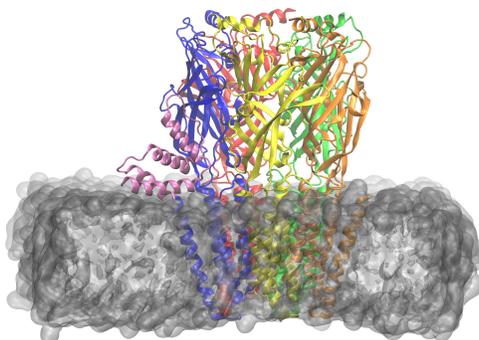


Figura 5.11: Configuración inicial para la simulación de DM del sistema formado por el Complejo 2 del receptor GABA_A y DBI (lila), y la membrana de POPC (gris).

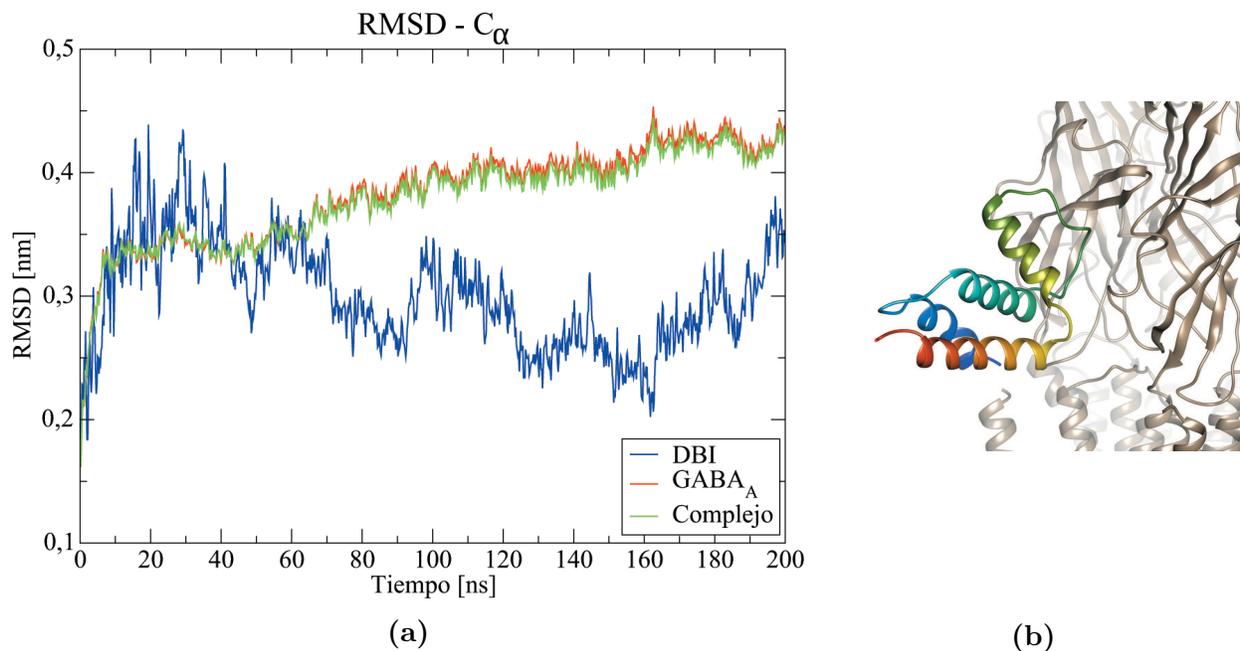


Figura 5.12: a. Se calculó la desviación cuadrática media de los C_α de DBI, el receptor y el complejo, realizando un ajuste sobre los C_α del Complejo 2. El gráfico revela que si bien la proteína es móvil en relación al complejo, la desviación es menor que la del receptor; b. estructura representativa de la simulación. DBI es representada en multicolor y el receptor GABA_A en beige.

El servidor web HyPPI clasificó a la estructura representativa de la *clusterización* con un 66% de probabilidad de ser un complejo transitivo (Figura 5.11.b). Cabe destacar que los residuos pertenecientes a DBI que apuntan hacia la membrana son de carácter polar.

Se analizaron las interacciones permanentes a lo largo de la producción. Resulta destacable que en el Complejo 2, DBI estableció interacciones del tipo puente de hidrógeno con los *loops* relacionados con los mecanismos de apertura y cierre del canal (Tabla 5.9). Estas interacciones particulares podrían tener influencia directa en la modulación del receptor GABA_A por parte de DBI. Es por ello que α_1 His142, α_1 Glu144, α_1 Ala150, α_1 Met158 y α_1 Asp159 del Cys-Loop, y α_1 Tyr282 del Loop M2-M3, se señalan como residuos que deberían ser estudiados experimentalmente.

Tabla 5.9: Interacciones establecidas a lo largo de la simulación de DM del complejo 2.

Puentes de hidrógeno (ocupación > 10 %)		Puentes de hidrógeno (1 % < ocupación < 10 %)	
Receptor	Péptido	Receptor	Péptido
α_1 Glu144	Ser66	α_1 Glu144	Glu68
α_1 Glu144	Lys67	α_1 Ile202	Glu43
α_1 Ser200	Gly46	α_1 Ala150	Lys67
α_1 His216	Asn41	α_1 Asp199	Asn41
α_1 Ile202	Arg44	α_1 Lys220	Gln2
γ_2 Tyr58	Glu43	α_1 Gln204	Glu43
α_1 Ser200	Met48	α_1 Tyr282	Ser66
α_1 Asp199	Trp55	α_1 Asp159	Lys67
γ_2 Asn60	Asn41	α_1 His218	Thr36
γ_2 Asn60	Glu43	α_1 Met158	Gln2
γ_2 Asn60	Thr42	α_1 Ile202	Thr42
		α_1 His142	Asp49

Sin embargo, ninguna de las dos conformaciones contuvo al fragmento correspondiente al péptido OP dentro del sitio de unión. Esto podría indicar que la orientación encontrada

no representa una conformación activa, o bien que representa un modo de unión alternativo al de los péptidos de menor longitud. Debido al tamaño de la proteína y a la cercanía a la membrana plasmática es esperable que no logre penetrar al sitio de unión de la misma forma que los péptidos más chicos.

En todos los casos de estudio el residuo α_1 Lys156 mantiene contactos polares con DBI y sus péptidos. Por esta razón se realizó la mutación de este residuo por Ile, Gly y Glu, y se repitieron los docking mediante HADDOCK. Sin embargo, no se registraron modificaciones en los puntajes o complejos obtenidos.

5.3.4. Interacción DBI - Diazepam

Ante la incógnita respecto de una posible interacción entre la proteína DBI y el modulador alostérico positivo diazepam, se realizó un estudio de docking molecular mediante Autodock Vina. El modo de unión con mejor puntaje ubicó a diazepam en el sitio de unión propuesto para los ácidos grasos (Figura 5.13.b). Para corroborar la estabilidad de la unión se realizó una dinámica molecular del sistema en solvente explícito.

En la simulación de DM de DBI con diazepam dockeado en su cavidad de unión, el ligando se mantuvo en el sitio a lo largo de toda la trayectoria; sin embargo, la hélice 1 de la proteína se desestructuró hacia el final de la simulación (Figura 5.13.c). Esto podría ser producto del empleo del campo de fuerza *gromos53a6*, que posee una tendencia a perder contenido de esta estructura secundaria [283] o bien debido a la presencia de diazepam.

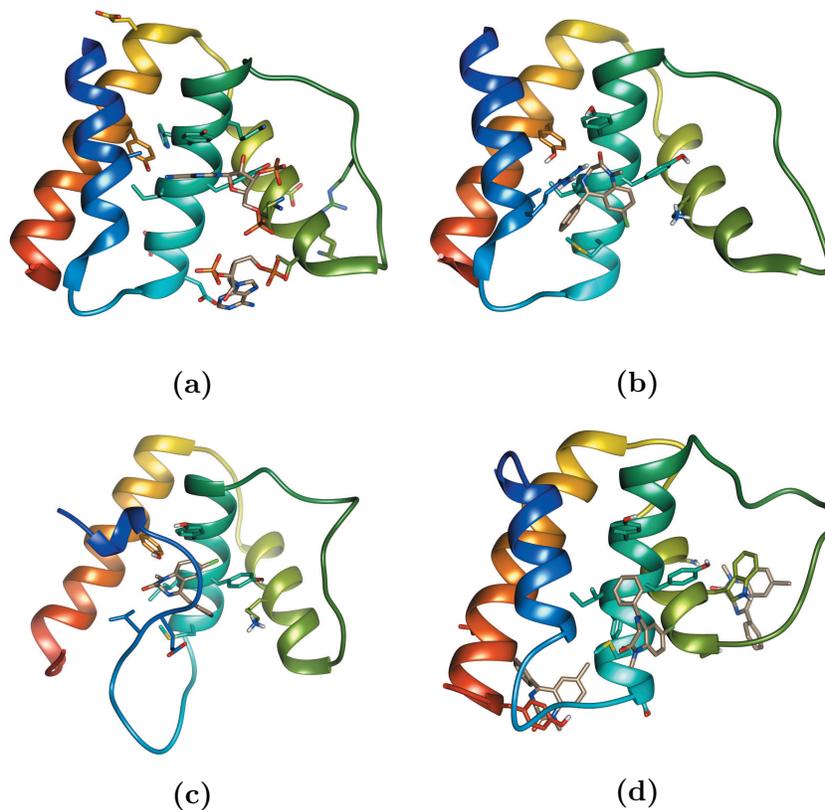


Figura 5.13: a. Estructura cristalográfica PDB ID: 2CB8 de DBI unido al compuesto Miristoil CoA; b. Complejo DBI-diazepam obtenido del docking con ADV; c. Complejo DBI-diazepam luego de la simulación de DM; d. Resultado de la simulación de DBI y cinco moléculas de diazepam.

En los primeros 100 ns de la simulación de DM de DBI con cinco moléculas de diazepam, se pudo observar que uno de los ligandos se acomodó en el sitio de unión predicho por el docking (que es el sitio de unión para los ácidos grasos) y los ligandos restantes se unieron a distintos sitios alrededor de la proteína.

Se compararon las estructuras de ACBP (DBI) cristalizada con el ligando Miristoil CoA (PDB ID: 2CB8) (Figura 5.13.a), la estructura cristalizada sin ligando (PDB ID: 2FJ9) luego del docking de diazepam (Figura 5.13.b), dicha estructura luego de 220 ns de simulación de DM (Figura 5.13.c) y la estructura luego de 106 ns de simulación de la estructura PDB ID: 2FJ9 rodeada por cinco moléculas de diazepam (Figura 5.13.d). De dicha comparación se observó que las hélices 2 y 4 permanecieron inalteradas, mientras que la hélice 1 y el *loop* que conecta las hélices 2 y 3 fueron las que sufrieron mayores modificaciones en los complejos obtenidos de la DM (Figura 5.14). La hélice 3 mostró cambios sólo en la simulación con los cinco ligandos (una de las moléculas de diazepam se ubicó entre esta y el *loop*).

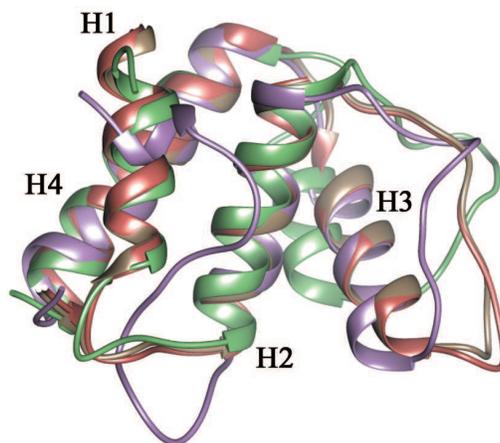


Figura 5.14: Superposición de las estructuras de DBI. En beige la estructura (PDB ID: 2CB8), en rosa PDB ID: 2FJ9 luego del docking de diazepam, en violeta la simulación de dicha estructura, en verde la simulación de PDB ID: 2FJ9 junto con cinco moléculas de diazepam.

Respecto de las interacciones particulares de cada sistema, se advirtió que los ligandos de la estructura cristalográfica interactúan con los residuos Met25, Leu26, Tyr29, Lys55, Val13 y Leu16. Por su parte, el complejo obtenido mediante docking muestra a diazepam interactuando hidrofóbicamente con Val13, Arg14, Ile28 y Tyr29, y luego de la dinámica molecular mantiene interacciones de tipo hidrofóbicas con Tyr29, un puente de hidrógeno con el esqueleto de Val13 y una interacción del tipo π -stacking con Tyr32. Así mismo, en la DM con los cinco ligandos, el compuesto que se unió a dicho sitio mantuvo interacciones hidrofóbicas con Met25, Leu26, Ile28, Tyr29, y puentes de hidrógeno y una interacción tipo cation- π con Arg14.

En todos los casos diazepam permaneció unido a DBI. Si bien las interacciones no fueron las mismas, se caracterizaron por establecer mayormente contactos hidrofóbicos, esto podría explicar la tendencia a mantenerse dentro del sitio de unión en lugar de explorar conformaciones más solvatadas.

5.4. Conclusiones

En esta sección se estudió la unión de la proteína DBI, el péptido ODN y el péptido OP al receptor GABA_A. OP forma parte de ODN y éste a su vez, es parte de DBI. En los modelos presentados no se observó exactamente el mismo patrón de interacciones; no

obstante, los aminoácidos α_1 His102, α_1 Glu144, α_1 Lys156, α_1 Asp199, α_1 Ser200, α_1 Ile202, α_1 Glu209, γ_2 Tyr58 y γ_2 Asn60 fueron detectados como partícipes de la uniones para los tres sistemas. Por lo tanto, se proponen estudios de mutagénesis dirigida que apunten hacia estos aminoácidos del receptor. Así mismo, Asn41, Thr42, Glu43, Arg44, Asp49 y Lys53, son candidatos para ser estudiados por parte de DBI.

Por otro lado, los residuos pertenecientes al Cys-Loop, y el Loop M2-M3 (α_1 His142, α_1 Glu144, α_1 Ala150, α_1 Met158, α_1 Asp159 y α_1 Tyr282) que establecieron en las simulaciones de DM interacciones con DBI deberían ser tenidos en cuenta para futuros experimentos ya que pertenecen a regiones relacionadas con el *gating* del receptor.

En cuanto a la interacción de DBI con diazepam, si bien no hay información experimental que respalde dicha interacción, y la tendencia de los ligandos de acercarse a la proteína podría ser un artefacto de la simulación, resulta interesante que diazepam se una *in silico* al sitio de unión de ácidos grasos de esta proteína. Además, debido a que el mecanismo por el cual DBI inhibe la acción de diazepam es aún desconocido, es plausible que exista más de un camino por el cuál esto suceda. Esta hipótesis es un punto de partida para realizar estudios experimentales que permitan analizar la posible interacción de estas dos moléculas y corroborarla como un mecanismo alternativo de la modulación del funcionamiento del receptor.

Este capítulo presenta estudios preliminares sobre la interacción entre las proteínas DBI y los receptores GABA_A. El estudio computacional es desafiante debido a la escasa información experimental sobre dicha unión que permita guiar la interpretación de los resultados obtenidos. Por este mismo motivo, el estudio es pertinente. Los resultados propuestos en este capítulo tienen carácter predictivo y, a partir de un cuidadoso análisis, permitieron la generación de hipótesis para el desarrollo de estudios experimentales.

Capítulo 6

Conclusiones

6.1. Conclusiones generales

Existen innumerables motivaciones para abordar el estudio estructural y funcional de los miembros de la subfamilia de receptores GABA_A. Por ejemplo, desde una perspectiva farmacológica, el desarrollo de fármacos con funciones específicas requiere conocimientos precisos de los sitios de unión de la proteína receptora; además, ciertas enfermedades conocidas como canalopatías son causadas por mutaciones con impacto estructural directo, las cuales necesitan ser caracterizadas para desarrollar tratamientos terapéuticos apropiados [284].

Con la información disponible hasta el momento se ha avanzado considerablemente tanto en el desarrollo de fármacos como en el entendimiento del rol de estos receptores en la salud de los mamíferos. Sin embargo, aún falta mucho para comprender de manera detallada su funcionamiento. Los receptores presentan una complejidad estructural muy alta, no se conocen aún los mecanismos de propagación de la información dentro del canal, y tampoco se tiene certeza respecto de la cantidad, ni descripción de los estados conformacionales posibles. En vistas de la estructura del subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ recientemente publicada, se presenta una alentadora escena. Por primera vez, estructuras experimentales están disponibles para el estudio de estos receptores, así como también del modo de unión del neurotransmisor GABA y el antagonista flumazenil. No obstante, su resolución es baja (3,9Å) y por lo tanto aún existen muchas incertezas.

Consideramos que este trabajo de tesis aporta información valiosa respecto a interaccio-

nes del receptor GABA_A con biomoléculas que no han sido estudiadas previamente a nivel molecular. Así mismo, el desarrollo de un modelo del receptor validado mediante distintos enfoques y que sea capaz de representar la información experimental disponible es muy importante para continuar el estudio exhaustivo de estos receptores.

A lo largo del trabajo, han surgido preguntas del tipo epistemológicas tales como ¿Cuál es la validez de los resultados obtenidos mediante simulaciones computacionales? ¿Es necesaria la contrastación con información experimental? ¿Cuál es el límite de la metodología que se está empleando? Si bien estas preguntas se apartan del propósito central de la tesis, consideramos que fueron fundamentales para establecer la validez del trabajo desarrollado.

El valor de los modelos y de las simulaciones puede ser evaluado en forma integral en función de su aplicabilidad y su veracidad a través de procesos de validación y verificación respectivamente [285]. La validación está relacionada con la capacidad del modelo de predecir aquello observado en la naturaleza, y la veracidad está íntimamente ligada a la ejecución del mismo. A lo largo de esta tesis se emplearon métodos computacionales que han sido ampliamente validados y han sido empleados en sistemas similares para producir nuevos conocimientos. Así mismo, se contrastaron, siempre que fue posible, los resultados con información experimental. En los pocos casos en los que esto no fue posible, se plantearon hipótesis que podrían ser validadas mediante otros métodos.

Desde otro punto de vista, hay autores que argumentan que el conocimiento producido mediante simulaciones es autónomo [285, 286]. Es decir, que no puede ser completamente corroborado por observaciones. Esto ocurre porque las simulaciones se emplean usualmente para estudiar fenómenos cuya observación resulta compleja o incluso imposible con la tecnología actual, tal es el caso de la observación directa de interacciones a nivel intermolecular.

En conclusión, esta tesis aporta a la validación de un nuevo paradigma en el cual las simulaciones computacionales constituyen una tercera rama de la ciencia capaz de generar conocimiento por sí mismo y que permite, a su vez, comprender, interpretar y relacionar la experimentación con la teoría. Además, las simulaciones computacionales resultan versátiles y económicas. La interacción fluida y constante entre los estudios *in silico*, *in vitro* e *in vivo* resulta imprescindible para un estudio abarcativo de un sistema tan complejo como lo es el receptor GABA_A.

6.2. Conclusiones particulares

En este trabajo de tesis se realizó un modelo del receptor GABA_A del subtipo $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ validado mediante distintas técnicas. Así mismo, se estudió de forma exhaustiva la unión de ligandos farmacológicamente relevantes a los sitios de unión ortostéricos y de gran afinidad de las benzodiazepinas, y se analizó *in silico*, por primera vez, la interacción del receptor con la proteína *Diazepam Binding Inhibitor* y con los péptidos derivados de su digestión triptica.

El receptor GABA_A fue modelado por homología y validado mediante el estudio de sus propiedades estereoquímicas, el análisis de interacciones con ligandos en los sitios de unión extracelulares y mediante su estabilidad en simulaciones de dinámica molecular. Los resultados fueron favorables, se ha probado que el modelo es capaz de reproducir datos experimentales respecto de la unión de ligandos del sitio ortostérico y de la cavidad de gran afinidad de las benzodiazepinas. Así mismo, el modelo pudo ser contrastado con una estructura experimental resuelta recientemente demostrando una vez más su validez.

El análisis de la unión de ligandos permitió detectar rotámeros de cadenas laterales fundamentales para una correcta unión, tal como el de la α_1 His102. También la conformación de los ligandos resultó crucial para una correcta unión en el sitio. Para cada ligando las interacciones relevantes fueron comprobadas y, en algunos casos, se propusieron contactos adicionales. El comportamiento de los ligandos y del receptor a lo largo de las simulaciones de DM reflejan la estabilidad de cada uno de los modos de unión propuestos.

Se presenta por primera vez un estudio computacional de la interacción entre una proteína con múltiple funcionalidad, DBI, y el receptor GABA_A. El análisis de los resultados permitió proponer formas de unión independientes para los péptidos de distintas longitudes y para la proteína completa. La razón de estas diferencias podría radicar en formas de unión alternativas inherentes a la acción de cada uno de los péptidos o en que no todos los modos de unión hallados sean posibles. El proceso de modelado, por su naturaleza no determinística, puede generar modos energéticamente factibles, pero que no representen una situación probable.

6.3. Perspectivas a Futuro

El cálculo de energía libre mediante técnicas de muestreo avanzado, si bien es computacionalmente costoso, ha demostrado ser un buen criterio para determinar la validez de un modo de unión particular. Dichos estudios, a través de ABF o bien metadinámica, pueden realizarse en sistemas mutados para determinar la influencia de aminoácidos como la α_1 His102.

El estudio *in silico* de la interacción entre el receptor GABA_A y DBI cumplió su objetivo por el momento y es el turno de los experimentalistas de analizar la interacción basada en la información provista por este trabajo. Entre las posibles técnicas a implementar, las espectroscopías ESR (Electron Spin Resonance) y EPR (Electron Paramagnetic Resonance) son prometedoras ya que permitirían mediante *Site-directed spin labeling* determinar las regiones de mayor y menor movilidad. Para ello se emplean mutaciones por cisteínas, las cuales luego son modificadas con un marcador de spin. DBI no presenta cisteínas por lo tanto se mutarían residuos propuestos para la unión, así como también residuos en las regiones opuestas, que estarían expuestos al solvente y posiblemente sean regiones más móviles. Se han empleado estas técnicas para estudiar cambios en la movilidad o exposición al solvente, así como también para investigar la dinámica de complejos de proteínas [287, 288].

Sugerimos además, estudios de mutagénesis dirigida, para determinar la influencia de los aminoácidos propuestos en la interacción del receptor con DBI y sus fragmentos peptídicos. De contar con mayor información experimental respecto de esta unión se podría analizar la dinámica de la interacción mediante simulaciones de DM.

Apéndice A

Compilación de la información experimental sobre la unión de ligandos a los sitios de unión estudiados

Tabla A.1: Interacciones sugeridas experimentalmente entre ligandos y los residuos pertenecientes a la subunidad β_2 del sitio de unión ortostérico.

Loop	Residuo	Interacción	Fuente
A	β_2 Y97	<ul style="list-style-type: none">• Interacción Cation-π con GABA.• Estudios de SCAM muestran que es parte del sitio de unión.• Su mutación reduce la sensibilidad hacia GABA y gabazine .	[289] [290] [290]
	β_2 L99	<ul style="list-style-type: none">• Estudios de SCAM muestran que es parte del sitio de unión, pese a no interactuar directamente con GABA.	[290]
	β_2 E155	<ul style="list-style-type: none">• Su mutación afecta la apertura del canal y debilita la unión de agonistas.	[291]
	β_2 S156	<ul style="list-style-type: none">• Su mutación por Cisteína afecta la activación por GABA y la inhibición por gabazine.• Hipotético puente de hidrógeno con GABA.	[291] [291]
B	β_2 Y157	<ul style="list-style-type: none">• Se ha propuesto que interactúa a través de su grupo hidroxil (No haría cation-π).	[289]

Loop	Residuo	Interacción	Fuente
		<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación disminuye la sensibilidad y afinidad aparentes de GABA y muscimol. • Se propone una interacción con el grupo 3-isoxaszole de muscimol • Cuando se muta por Serina, gabazine y bicuculline actúan como agonistas parciales <ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Fenilalanina disminuye en mayor medida la sensibilidad hacia GABA que cuando se muta a Serina, Asparagina o Threonina, que también disminuyen su sensibilidad. 	[292] [292] [292] [292]
	β_2 G158	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación reduce la afinidad por GABA y gabazine. 	[291]
	β_2 T160	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación disminuye la sensibilidad y afinidad aparentes de GABA y muscimol. • Estudios de SCAM muestran que es parte del sitio de unión y participa en la apertura del canal. 	[292] [291]
	β_2 D163	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de SCAM muestran que es parte del sitio de unión y participa en la apertura del canal. 	[291]
C	β_2 F200	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación afecta la unión de gabazine y GABA y la activación del canal. 	[293]
	β_2 S201	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación reduce la sensibilidad hacia GABA y gabazine. 	[293]
	β_2 T202	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación disminuye la afinidad y sensibilidad aparentes por GABA, muscimol y gabazine. 	[292, 293]
	β_2 G203	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación reduce la sensibilidad hacia GABA y gabazine. 	[293]
	β_2 S204	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de SCAM muestran que forma parte del sitio de unión. • Su mutación no afecta la afinidad de GABA ni de gabazine. 	[293] [293]
	β_2 Y205	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de SCAM muestran que forma parte del sitio de unión. • Su mutación disminuye la afinidad aparente de GABA, muscimol, bicuculline y gabazine. 	[293] [289, 292, 293]
	β_2 R207	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de SCAM muestran que forma parte del sitio de unión. • Su mutación disminuye la afinidad aparente de GABA y otros agonistas, pero no de gabazine. • Estabiliza la unión de antagonistas. • No participa de la apertura del canal. 	[293] [93, 294] [294] [93]
	β_2 S209	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de SCAM muestran que forma parte del sitio de unión. • Su mutación no afecta la afinidad de unión de GABA ni de gabazine. 	[293] [293]

Tabla A.2: Interacciones sugeridas experimentalmente entre ligandos y los residuos pertenecientes a la subunidad α_1 del sitio de unión ortostérico.

Loop	Residuo	Interacción	Fuente
D	α_1 D63	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM muestran que gabazine protege a este residuo, mientras que GABA no. 	[110]
	α_1 F65	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM lo identificaron como parte del sitio de unión. Estudios de <i>Photoaffinity Labelling</i> muestran que reacciona con el grupo carboxilato de muscimol. Su mutación disminuye la afinidad de unión de GABA, bicuculline y gabazine 	[110] [295] [110]
	α_1 R67	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM y <i>Photoaffinity Labelling</i> lo identificaron como parte del sitio de unión. Se propone como el punto de unión del grupo carboxilo de GABA. Su mutación disminuye la afinidad de unión de GABA y otros agonistas. Se ha propuesto que obstruye la unión de antagonistas. No está involucrado en la activación del canal. Este residuo se encuentra conservado en todas las subunidades α, π y ρ de receptores GABA_A. 	[94, 110] [94, 110] [94, 294] [294] [294] [110]
	α_1 S69	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM lo identifican como parte del sitio de unión. 	[94, 110]
E	α_1 N116	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM indican que limita el sitio de unión. 	[296]
	α_1 L118	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM indican que limita el sitio de unión. 	[296]
	α_1 R120	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM indican que limita el sitio de unión. Su mutación reduce la afinidad de unión de muscimol y gabazine, y reduce la sensibilidad de GABA. 	[296] [297]
	α_1 I121	<ul style="list-style-type: none"> Su mutación reduce la sensibilidad de GABA y muscimol pero no bicuculline. 	[298]
	α_1 T130	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM indican que limita el sitio de unión. 	[296]
	α_1 R132	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM indican que limita el sitio de unión. Su mutación reduce la unión de GABA. Se ha propuesto como estabilizador de la unión de antagonistas. Está involucrado en el proceso de activación del canal. 	[296] [294] [294] [294]
F	α_1 V179	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM indican que forma parte del sitio de unión, aunque no interactuaría directamente con GABA. 	[240]

Loop	Residuo	Interacción	Fuente
	α_1 V181	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM indican que forma parte del sitio de unión, aunque no interactuaría directamente con GABA. 	[240]
	α_1 D184	<ul style="list-style-type: none"> Estudios de SCAM indican que forma parte del sitio de unión, aunque no interactuaría directamente con GABA. 	[240]

Tabla A.3: Interacciones sugeridas experimentalmente entre ligandos y los residuos pertenecientes a la subunidad α_1 del sitio de unión de gran afinidad de las Benzodiazepinas.

Loop	Residuo	Interacción	Fuente
A	α_1 D98	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación afecta la afinidad y la eficacia de moduladores positivos y flumazenil 	[106, 299]
	α_1 F100	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación afecta la unión y la eficacia de los moduladores positivos. • Involucrado en interacciones del tipo π-stacking. • Si se muta por Cisteína, cambia la acción de eszopiclone y diazepam de moduladores positivos a moduladores negativos, reduce la afinidad de unión de zolpidem y eszpiclone. La unión de flumazenil observó cambios en algunos estudios, mientras que en otros permaneció inalterada. • Al ser mutado puede interferir con la disposición espacial de las cadenas laterales de α_1His102 y α_1Tyr160. 	[300] [1] [106, 299, 300] [106]
	α_1 H102	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de SCAM mostraron que el átomo de cloro de diazepam apunta hacia este residuo. • Es marcado por foto-afinidad por flunitrazepam. • Fue identificado a partir de estudios de mutagénesis dirigida e intercambio de dominio, como necesario para la unión de diazepam y zolpidem. • Al ser mutado por Arginina disminuye la unión de flumazenil pero no afecta a la unión de Ro15-4513 (las i-BDZs se unen a receptores que contengan las subunidades α_4 y α_6). Sin embargo Ro15-4513 se convierte en un modulador positivo. • Su mutación disminuye la afinidad de unión de zopiclone (la reducción es menor si se muta por una Fenilalanina). • Estudios de <i>Proximity-accelerated chemical coupling</i> ubican el sustituyente-7 de las i-BDZs cercano a este residuo. • Su mutación por Arginina disminuye la afinidad de unión por diazepam, volviéndose insensible a este ligando. 	[263, 265, 301] [260] [302, 303] [302, 304] [302, 303] [270] [104, 304]
	α_1 N103	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de <i>Proximity-accelerated chemical coupling</i> muestran que apunta hacia el sitio de unión. • El átomo de cloro de diazepam y el sustituyente-7 de las i-BDZs apuntan hacia este residuo, pero es menos accesible que α_1H102. • Su mutación por Cisteína no afecta la unión de flumazenil. 	[300] [263, 300] [300]

Loop	Residuo	Interacción	Fuente
B	α_1 G158	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación afecta la unión y eficacia de agonistas. • El átomo de cloro de diazepam apunta hacia este residuo. • Estudios de <i>Proximity-accelerated chemical coupling</i> ubican el sustituyente-7 de las i-BDZs cercano a este residuo. • Su mutación por Cisteína reduce la afinidad de unión de zolpidem y eszopiclone. 	[299] [263] [270] [106]
	α_1 S159	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Cisteína disminuye la afinidad de unión de flunitrazepam y flumazenil. 	[263, 270]
	α_1 Y160	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de SCAM indican que limita el sitio de unión. • Su mutación por Serina genera pérdida de afinidad por diazepam y flumazenil. • Su mutación por Cisteína disminuye la afinidad de unión de flunitrazepam y flumazenil. 	[263] [305] [263, 270]
	α_1 Y162	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Alanina aumenta la eficiencia de diazepam y eszopiclone. 	[306]
	α_1 T163	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación afecta la afinidad por diazepam. 	[302]
C	α_1 G201	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Cisteína reduce la afinidad de unión de flurazepam, eszopiclone y zolpidem. • Su mutación por Ácido Glutámico reduce la afinidad de unión de zolpidem, mientras que la de flumazenil aumenta y la de diazepam no cambia. 	[106, 299] [302, 307, 308]
	α_1 V203	<ul style="list-style-type: none"> • El átomo de cloro de diazepam apunta hacia este residuo. • Estudios de <i>Proximity-accelerated chemical coupling</i> ubican el sustituyente-7 de las i-BDZs cercano a este residuo. • Su mutación por Cisteína disminuye la afinidad de unión de zolpidem y eszopiclone. 	[263] [270] [106]
	α_1 S205	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación afecta la afinidad de unión de zolpidem. 	[106]
	α_1 S206	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de <i>Proximity-accelerated chemical coupling</i> han demostrado su cercanía al átomo C3 del anillo de las benzodiazepinas. • Su mutación por Alanina no afecta la potenciación de BDZs clásicas. • Su mutación por Asparagina disminuye la afinidad de unión de i-BDZs pero no flunitrazepam. 	[263, 265] [306] [309]
	α_1 T207	<ul style="list-style-type: none"> • Relacionado con la eficacia de flurazepam, eszopiclone y zolpidem, pero no con su afinidad de unión. 	[299]

Loop	Residuo	Interacción	Fuente
		<ul style="list-style-type: none"> • Estudios de <i>Proximity-accelerated chemical coupling</i> han demostrado su cercanía al átomo C3 del anillo de las benzodiazepinas. • Comparte contactos polares con el grupo N-metilo de diazepam, el cual apunta hacia afuera de la cavidad. • Su mutación por Alanina muestra una pequeña disminución en la afinidad de unión de flumazenil, diazepam y zolpidem. • Su mutación por Valina disminuye la afinidad de unión de diazepam y zolpidem y un aumento en la unión de flumazenil. 	<p>[263]</p> <p>[263]</p> <p>[306,310]</p> <p>[277,308]</p>
	α_1 G208	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Cisteína disminuye la afinidad de unión de flunitrazepam y flumazenil. 	[263,270]
	α_1 Y210	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación afecta la afinidad de unión y la eficacia de agonistas. • Su propiedad aromática es importante para la unión de ligandos. • Su mutación por Glutamina o Cisteína anulan la afinidad de unión de flumazenil y flunitrazepam. • Su mutación por Fenilalanina reduce la afinidad de unión de flumazenil, diazepam y zolpidem, mientras que su reemplazo por Serina o Alanina impide la unión de estos ligandos. • El ligando ro15-4513 es fotoincorporado por este residuo, se propone que interactúa con el grupo Azido. 	<p>[299]</p> <p>[310]</p> <p>[106]</p> <p>[305,310]</p> <p>[268]</p>
	α_1 V212	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Cisteína aumenta la eficacia de zolpidem. • El átomo de cloro de diazepam apunta hacia este residuo. • Estudios de <i>Proximity-accelerated chemical coupling</i> ubican el sustituyente-7 de las i-BDZs cercano a este residuo. • Es importante para la unión de flunitrazepam y diazepam, mientras que ro15-4513 prefiere una Isoleucina en esta posición. 	<p>[299]</p> <p>[263]</p> <p>[270]</p> <p>[302]</p>

Tabla A.4: Interacciones sugeridas experimentalmente entre ligandos y los residuos pertenecientes a la subunidad γ_2 del sitio de unión de gran afinidad de las Benzodiazepinas.

Loop	Residuo	Interacción	Fuente
β_{1S}	γ_2M57	<ul style="list-style-type: none"> • Esencial para la unión de gran afinidad del flunitrazepam. • Importante para la unión de zolpidem. 	[311] [312]
	γ_2Y58	<ul style="list-style-type: none"> • Esencial para la unión de gran afinidad de flunitrazepam. • Su mutación por Cisteína disminuye la afinidad de unión de flunitrazepam y diazepam, pero no de flumazenil. • Estudios de <i>Proximity-accelerated chemical coupling</i> relacionan este residuo con el átomo C3 del anillo de benzodiazepinas y el sustituyente-7. 	[311] [265] [265]
	γ_2N60	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Cisteína disminuye la afinidad de unión de flunitrazepam y diazepam, pero no de flumazenil. • Estudios de <i>Proximity-accelerated chemical coupling</i> relacionan este residuo con el sustituyente-7 de las BDZs clásicas. 	[265] [265]
	γ_2S61	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Cisteína afecta severamente la afinidad de unión de flunitrazepam y elimina la unión de flumazenil. 	[265]
D	γ_2F77	<ul style="list-style-type: none"> • Es esencial para el funcionamiento del receptor y la unión de flumazenil y clonazepam. • Su mutación por Isoleucina resulta en una pérdida completa de la afinidad por zolpidem y flumazenil, mientras que la afinidad de unión del flunitrazepam se mantiene. • Su mutación por Cisteína resulta en una pérdida completa de la potenciación debido a flurazepam, zolpidem, flunitrazepam y flumazenil. • Su mutación por Leucina resulta en una pérdida completa de la potenciación y de la afinidad de unión de zolpidem, mientras que la afinidad por diazepam y flumazenil solamente se reduce. • Su mutación por Tirosina reduce considerablemente la afinidad de unión de diazepam y flunitrazepam, mientras que aumenta ligeramente la de zolpidem y no afecta la unión de flumazenil. • Su mutación por Triptofano reduce considerablemente la afinidad de unión de diazepam y flumazenil. 	[313] [313] [107, 263] [306, 314] [277, 314] [314]
	γ_2A79	<ul style="list-style-type: none"> • Importante para la unión de gran afinidad de las BDZs clásicas y de las i-BDZs. 	[269, 311]

Loop	Residuo	Interacción	Fuente
		<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Cisteína reduce la afinidad de unión de zolpidem y eszopiclone. • Estudios de SCAM mostraron que el sustituyente-3' de las i-BDZs se encuentra cercano a este residuo. • Estudios de SCAM revelaron que forma parte del sitio de unión. • Su mutación por Tirosina afecta la unión de las i-BDZs pero no de flunitrazepam. 	[106] [269] [107] [269]
	γ_2 T81	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación afecta la unión de las i-BDZs y de las BDZs clásicas en menor manera. • Su mutación por Cisteína reduce la afinidad de unión de zolpidem. • Estudios de SCAM revelaron que forma parte del sitio de unión. • Estudios de SCAM mostraron que el sustituyente-3' de las i-BDZs se encuentra cercano a este residuo. • Estudios de SCAM mostraron que flurazepam no protege a este residuo de la modificación covalente. 	[269, 311] [106] [107] [269] [269]
E	γ_2 M130	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Cisteína reduce la afinidad de unión de flurazepam, eszopiclone y zolpidem. • Sin embargo, otros estudios muestran que la mutación por Cisteína aumenta la afinidad de unión de zolpidem. • Su mutación por Leucina genera una disminución en la afinidad de unión de zolpidem, mientras que la de diazepam sólo es levemente reducida. • No afecta la unión de flumazenil, pero sí es determinante en la unión de flunitrazepam y clonazepam. 	[299] [106] [277, 312] [313]
	γ_2 R132	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Cisteína reduce la afinidad de unión de flurazepam, eszopiclone y zolpidem. • Sin embargo, otros estudios muestran que la mutación por Cisteína aumenta la afinidad de unión de zolpidem. 	[299] [106]
	γ_2 T142	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Serina genera que ro15-4513 y flumazenil sean potentes moduladores positivos. A su vez aumenta la modulación de diazepam, clonazepam y flunitrazepam; mientras que la modulación por zolpidem se reduce a la mitad. 	[315]

Loop	Residuo	Interacción	Fuente
	γ_2 R144	<ul style="list-style-type: none"> • Su mutación por Cisteína reduce la afinidad de unión de eszopiclone. 	[106]
F	γ_2 V190	<ul style="list-style-type: none"> • Si bien no estaría en contacto directo con diazepam, está asociado con la orientación del mismo. • Estudios de <i>Proximity-accelerated chemical coupling</i> han demostrado que las BDZs clásicas orientan su grupo NCH₃ hacia este residuo. 	[265] [265]
	γ_2 R197	<ul style="list-style-type: none"> • Relacionado con la eficacia de flurazepam, eszopiclone y zolpidem, pero no con su afinidad de unión. • Estudios de SCAM muestran que flurazepam y zolpidem demuestran su modificación covalente, sugiriendo movimientos en el loop F luego de la unión de los ligandos. 	[299] [276]

Bibliografía

- [1] R. Bergmann, K. Kongsbak, P. L. Sørensen, T. Sander, and T. Balle, “A Unified Model of the GABAA Receptor Comprising Agonist and Benzodiazepine Binding Sites,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, 2013.
- [2] P. S. Miller and A. R. Aricescu, “Crystal structure of a human GABAA receptor,” *Nature*, vol. 512, no. 7514, pp. 270–275, 2014.
- [3] M. J. Amundarain, J. F. Viso, F. Zamarreño, A. Giorgetti, and M. Costabel, “Orthosteric and benzodiazepine cavities of the $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ gabaa receptor: Insights from experimentally-validated in silico methods.,” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, no. just-accepted, pp. 1–69, 2018.
- [4] J. Berg, J. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry Fifth Edition*. 2002.
- [5] H. Lodish and S. L. Zipursky, “Molecular cell biology,” *Biochem. Mol. Biol. Educ*, vol. 29, pp. 126–133, 2001.
- [6] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. Bhat, H. Weissig, I. Shindyalov, and P. Bourne, “The Protein Data Bank,” *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 1, pp. 235–242, 2000.
- [7] P. W. Rose, A. Prlić, A. Altunkaya, C. Bi, A. R. Bradley, C. H. Christie, L. Di Costanzo, J. M. Duarte, S. Dutta, Z. Feng, R. K. Green, D. S. Goodsell, B. Hudson, T. Kalro, R. Lowe, E. Peisach, C. Randle, A. S. Rose, C. Shao, Y. P. Tao, Y. Valasatava, M. Voigt, J. D. Westbrook, J. Woo, H. Yang, J. Y. Young, C. Zardecki, H. M. Berman, and S. K. Burley, “The RCSB protein data bank: Integrative view of protein, gene and 3D structural information,” *Nucleic Acids Research*, vol. 45, no. Database, pp. D271–D281, 2017.
- [8] M. Sadowski and D. Jones, “The sequence–structure relationship and protein function prediction,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 19, no. 3, pp. 357–362, 2009.
- [9] M. Perutz, J. Kendrew, and H. Watson, “Structure and function of haemoglobin: Ii. some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 13, no. 3, pp. 669 – 678, 1965.
- [10] C. B. Anfinsen, “Principles that govern the folding of protein chains,” *Science*, vol. 181, no. 4096, pp. 223–230, 1973.

- [11] T. R. Hvidsten, A. Lægreid, A. Kryshafovich, G. Andersson, K. Fidelis, and J. Komorowski, “A comprehensive analysis of the structure-function relationship in proteins based on local structure similarity,” *PLOS ONE*, vol. 4, pp. 1–9, 07 2009.
- [12] C. Chothia and A. M. Lesk, “The relation between the divergence of sequence and structure in proteins,” *The EMBO journal*, vol. 5, no. 4, pp. 823–826, 1986.
- [13] E. Britannica *et al.*, “Encyclopædia britannica,” *Chicago: Common Law*, 2009.
- [14] E. Wallin and G. V. Heijne, “Genome wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms,” *Protein Science*, vol. 7, no. 4, pp. 1029–1038, 1998.
- [15] S. Piccoli, E. Suku, M. Garonzi, and A. Giorgetti, “Genome-wide Membrane Protein Structure Prediction,” *Current genomics*, vol. 14, no. 5, pp. 324–9, 2013.
- [16] M. S. Almén, K. J. Nordström, R. Fredriksson, and H. B. Schiöth, “Mapping the human membrane proteome: A majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin,” *BMC Biology*, vol. 7, p. 50, 2009.
- [17] J. Koehler Leman, M. B. Ulmschneider, and J. J. Gray, “Computational modeling of membrane proteins,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 83, no. 1, pp. 1–24, 2015.
- [18] X. Du, Y. Li, Y.-L. Xia, S.-M. Ai, J. Liang, P. Sang, X.-L. Ji, and S.-Q. Liu, “Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods,” *International journal of molecular sciences*, vol. 17, no. 2, p. 144, 2016.
- [19] E. X. Albuquerque, E. F. Pereira, M. Alkondon, and S. W. Rogers, “Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function,” *Physiological reviews*, vol. 89, no. 1, pp. 73–120, 2009.
- [20] N. Calimet, M. Simoes, J.-P. Changeux, M. Karplus, A. Taly, and M. Cecchini, “A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 42, pp. E3987–96, 2013.
- [21] M. Gielen, P. Thomas, and T. G. Smart, “The desensitization gate of inhibitory Cys-loop receptors,” *Nature Communications*, vol. 6, pp. 1–10, 2015.
- [22] S. P. Alexander, J. A. Peters, E. Kelly, N. V. Marrion, E. Faccenda, S. D. Harding, A. J. Pawson, J. L. Sharman, C. Southan, and J. A. Davies, “The concise guide to pharmacology 2017/18: Ligand-gated ion channels,” *British journal of pharmacology*, vol. 174, no. S1, 2017.
- [23] M. O. Ortells and G. G. Lunt, “Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors,” *Trends in neurosciences*, vol. 18, no. 3, pp. 121–127, 1995.
- [24] M. Jaiteh, A. Taly, and J. Hénin, “Evolution of Pentameric Ligand-Gated Ion Channels: Pro-Loop Receptors,” *PLoS one*, vol. 11, no. 3, p. e0151934, 2016.

- [25] P. R. Schofield, M. G. Darlison, N. Fujita, D. R. Burt, F. A. Stephenson, H. Rodriguez, L. M. Rhee, J. Ramachandran, V. Reale, T. A. Glencorse, *et al.*, “Sequence and functional expression of the gabaa receptor shows a ligand-gated receptor super-family,” *Nature*, vol. 328, no. 6127, p. 221, 1987.
- [26] R. W. Olsen and W. Sieghart, “International Union of Pharmacology. LXX . Subtypes of gamma-Aminobutyric Acid A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update,” *Pharmacological reviews*, vol. 50, no. 2, pp. 291–313, 1998.
- [27] D. Langosch, L. Thomas, and H. Betz, “Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 85, no. 19, pp. 7394–7398, 1988.
- [28] D. F. Cully, D. K. Vassilatis, K. K. Liu, P. S. Paress, L. H. Van der Ploeg, J. M. Schaeffer, and J. P. Arena, “Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from caenorhabditis elegans,” *Nature*, vol. 371, no. 6499, p. 707, 1994.
- [29] M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, S. Kikuyotani, Y. Furutani, T. Hirose, H. Takashima, S. Inayama, T. Miyata, *et al.*, “Structural homology of torpedo californica acetylcholine receptor subunits,” *Nature*, vol. 302, no. 5908, p. 528, 1983.
- [30] A. V. Maricq, A. S. Peterson, A. J. Brake, R. M. Myers, and D. Julius, “Primary structure and functional expression of the 5ht3 receptor, a serotonin-gated ion channel,” *Science*, vol. 254, no. 5030, pp. 432–437, 1991.
- [31] P. A. Davies, W. Wang, T. G. Hales, and E. F. Kirkness, “A novel class of ligand-gated ion channel is activated by zn²⁺,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 2, pp. 712–717, 2003.
- [32] G. Hassaine, C. Deluz, L. Grasso, R. Wyss, M. B. Tol, R. Hovius, A. Graff, H. Stahlberg, T. Tomizaki, A. Desmyter, *et al.*, “X-ray structure of the mouse serotonin 5-ht 3 receptor,” *Nature*, vol. 512, no. 7514, p. 276, 2014.
- [33] P. S. Miller and T. G. Smart, “Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 31, no. 4, pp. 161–174, 2010.
- [34] R. E. Hibbs and E. Gouaux, “Principles of activation and permeation in an anion-selective cys-loop receptor,” *Nature*, vol. 474, no. 7349, p. 54, 2011.
- [35] D. Colquhoun and L. G. Sivilotti, “Function and structure in glycine receptors and some of their relatives,” *TRENDS in Neurosciences*, vol. 27, no. 6, pp. 337–344, 2004.
- [36] A. J. Thompson, H. A. Lester, and S. C. Lummis, “The structural basis of function in cys-loop receptors,” *Quarterly reviews of biophysics*, vol. 43, no. 4, pp. 449–499, 2010.
- [37] J. Zhang, F. Xue, Y. Liu, H. Yang, and X. Wang, “The structural mechanism of the cys-loop receptor desensitization,” *Molecular Neurobiology*, vol. 48, no. 1, pp. 97–108, 2013.

- [38] T. Althoff, R. E. Hibbs, S. Banerjee, and E. Gouaux, “X-ray structures of glucr in apo states reveal a gating mechanism of cys-loop receptors,” *Nature*, vol. 512, no. 7514, p. 333, 2014.
- [39] M. Jatczak-Śliwa, K. Terejko, M. Brodzki, M. A. Michałowski, M. M. Czyzewska, J. M. Nowicka, A. Andrzejczak, R. Srinivasan, and J. W. Mozrzymas, “Distinct Modulation of Spontaneous and GABA-Evoked Gating by Flurazepam Shapes Cross-Talk Between Agonist-Free and Liganded GABAA Receptor Activity,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 12, no. August, pp. 1–18, 2018.
- [40] X. Huang, H. Chen, K. Michelsen, S. Schneider, and P. L. Shaffer, “Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha 3$ bound to antagonist strychnine,” *Nature*, vol. 536, pp. 277 – 280, 2015.
- [41] A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi, M. Stowell, and N. Unwin, “Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel,” *Journal of molecular biology*, vol. 288, no. 4, pp. 765–786, 1999.
- [42] N. Unwin, “Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 346, no. 4, pp. 967–989, 2005.
- [43] A. B. Smit, N. I. Syed, D. Shaap, J. van Minnen, J. Klumperman, K. S. Kits, H. Lodder, R. C. van der Schors, R. van Elk, B. Sorgedragar, K. BREJC, T. K. Sixma, and W. P. M. Geraerts, “A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission.,” *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 261–268, 2001.
- [44] K. Brejc, W. J. van Dijk, R. V. Klaassen, M. Schuurmans, J. van Der Oost, A. B. Smit, and T. K. Sixma, “Crystal structure of an ach-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors,” *Nature*, vol. 411, no. 6835, p. 269, 2001.
- [45] B. a. Cromer, C. J. Morton, and M. W. Parker, “Anxiety over GABA A receptor structure relieved by AChBP,” *Trends in biochemical sciences*, vol. 27, no. 6, pp. 280–287, 2002.
- [46] R. J. C. Hilf and R. Dutzler, “X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel.,” *Nature*, vol. 452, no. 7185, pp. 375–379, 2008.
- [47] R. J. C. Hilf and R. Dutzler, “Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel.,” *Nature*, vol. 457, no. 7225, pp. 115–118, 2009.
- [48] A. Tasneem, L. M. Iyer, E. Jakobsson, and L. Aravind, “Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels,” *Genome Biology*, vol. 6, no. 1, p. R4, 2004.
- [49] H. Nury, C. Van Renterghem, Y. Weng, A. Tran, M. Baaden, V. Dufresne, J.-P. Changeux, J. M. Sonner, M. Delarue, and P.-J. Corringer, “X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel,” *Nature*, vol. 469, no. 7330, p. 428, 2011.

- [50] J. Pan, Q. Chen, D. Willenbring, K. Yoshida, T. Tillman, O. B. Kashlan, A. Cohen, X.-P. Kong, Y. Xu, and P. Tang, "Structure of the pentameric ligand-gated ion channel elic cocrystallized with its competitive antagonist acetylcholine," *Nature communications*, vol. 3, p. 714, 2012.
- [51] C. L. Morales-Perez, C. M. Noviello, and R. E. Hibbs, "X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor.," *Nature*, vol. 538, no. 7625, pp. 411–415, 2016.
- [52] D. Laverty, P. Thomas, M. Field, O. J. Andersen, M. G. Gold, P. C. Biggin, M. Gielen, and T. G. Smart, "Crystal structures of a GABA A-receptor chimera reveal new endogenous neurosteroid-binding sites," *Nature Structural and Molecular Biology*, vol. 24, no. 11, pp. 977–985, 2017.
- [53] P. S. Miller, S. Scott, S. Masiulis, L. De Colibus, E. Pardon, J. Steyaert, and A. R. Aricescu, "Structural basis for GABA A receptor potentiation by neurosteroids," *Nature Structural and Molecular Biology*, vol. 24, no. 11, pp. 986–992, 2017.
- [54] R. Vijayan, N. Trivedi, S. N. Roy, I. Bera, P. Manoharan, P. V. Payghan, D. Bhattacharyya, and N. Ghoshal, "Modeling the closed and open state conformations of the gabaa ion channel-plausible structural insights for channel gating," *Journal of chemical information and modeling*, vol. 52, no. 11, pp. 2958–2969, 2012.
- [55] M. Ernst, D. Brauchart, S. Boresch, and W. Sieghart, "Comparative modeling of gabaa receptors: limits, insights, future developments," *Neuroscience*, vol. 119, no. 4, pp. 933–943, 2003.
- [56] T. Sander, B. Frølund, A. T. Bruun, I. Ivanov, J. A. McCammon, and T. Balle, "New insights into the gabaa receptor structure and orthosteric ligand binding: receptor modeling guided by experimental data," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 79, no. 5, pp. 1458–1477, 2011.
- [57] S. Zhu, C. M. Noviello, J. Teng, R. M. Walsh, J. J. Kim, and R. E. Hibbs, "Structure of a human synaptic GABAA receptor," *Nature*, vol. 559, no. 7712, p. 1, 2018.
- [58] E. Barnard, P. Skolnick, R. Olsen, H. Mohler, W. Sieghart, G. Biggio, C. Braestrup, A. Bateson, and S. Langer, "International union of pharmacology. xv. subtypes of γ -aminobutyric acid receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function," *Pharmacological reviews*, vol. 50, no. 2, pp. 291–314, 1998.
- [59] J. Simon, H. Wakimoto, N. Fujita, M. Lalande, and E. A. Barnard, "Analysis of the set of gabaa receptor genes in the human genome," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 40, pp. 41422–41435, 2004.
- [60] J. Fritschy, D. Benke, S. Mertens, W. Oertel, T. Bachi, and H. Möhler, "Five subtypes of type a gamma-aminobutyric acid receptors identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89, no. 15, pp. 6726–6730, 1992.

- [61] H. Möhler, “Gabaa receptor diversity and pharmacology,” *Cell and tissue research*, vol. 326, no. 2, pp. 505–516, 2006.
- [62] S. W. Baumann, R. Baur, and E. Sigel, “Forced subunit assembly in $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ gabaareceptors: Insight into the absolute arrangement,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 48, pp. 46020–46025, 2002.
- [63] V. Tretter, N. Ehya, K. Fuchs, and W. Sieghart, “Stoichiometry and assembly of a recombinant gabaa receptor subtype,” *Journal of Neuroscience*, vol. 17, no. 8, pp. 2728–2737, 1997.
- [64] G. B. Smith and R. W. Olsen, “Functional domains of gabaa receptors,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 16, no. 5, pp. 162–168, 1995.
- [65] S. J. Moss, G. H. Gorrie, A. Amato, and T. G. Smart, “Modulation of gabaa receptors by tyrosine phosphorylation,” *Nature*, vol. 377, no. 6547, pp. 344–348, 1995.
- [66] J. T. Kittler and S. J. Moss, “Modulation of gabaa receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition,” *Current opinion in neurobiology*, vol. 13, no. 3, pp. 341–347, 2003.
- [67] R. M. McKernan, T. W. Rosahl, D. S. Reynolds, C. Sur, K. A. Wafford, J. R. Atack, S. Farrar, J. Myers, G. Cook, P. Ferris, L. Garrett, L. Bristow, G. Marshall, A. Macaulay, N. Brown, O. Howell, K. W. Moore, R. W. Carling, L. J. Street, J. L. Castro, C. I. Ragan, G. R. Dawson, and P. J. Whiting, “Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABAA receptor [alpha]1 subtype,” *Nat Neurosci*, vol. 3, pp. 587–592, jun 2000.
- [68] U. Rudolph, F. Crestani, D. Benke, I. Brunig, J. A. Benson, J.-M. Fritschy, J. R. Martin, H. Bluethmann, and H. Mohler, “Benzodiazepine actions mediated by specific [gamma]-aminobutyric acidA receptor subtypes,” *Nature*, vol. 401, pp. 796–800, oct 1999.
- [69] F. Crestani, J. R. Martin, H. Möhler, and U. Rudolph, “Mechanism of action of the hypnotic zolpidem in vivo,” *British journal of pharmacology*, vol. 131, no. 7, pp. 1251–1254, 2000.
- [70] R. W. Olsen and W. Sieghart, “Gabaa receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology,” *Neuropharmacology*, vol. 56, no. 1, pp. 141 – 148, 2009. Ligand-Gated Ion Channels.
- [71] K. Löw, F. Crestani, R. Keist, D. Benke, I. Brünig, J. A. Benson, J.-M. Fritschy, T. Rüllicke, H. Bluethmann, H. Möhler, and U. Rudolph, “Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety,” *Science*, vol. 290, no. 5489, pp. 131–134, 2000.
- [72] F. Crestani, K. Löw, R. Keist, M.-J. Mandelli, H. Möhler, and U. Rudolph, “Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam,” *Molecular Pharmacology*, vol. 59, no. 3, pp. 442–445, 2001.

- [73] M. Täuber, E. Calame-Droz, L. Prut, U. Rudolph, and F. Crestani, “ α 2- γ -aminobutyric acid (gaba) a receptors are the molecular substrates mediating precipitation of narcosis but not of sedation by the combined use of diazepam and alcohol in vivo,” *European Journal of Neuroscience*, vol. 18, no. 9, pp. 2599–2604, 2003.
- [74] H. Möhler, “The legacy of the benzodiazepine receptor: from flumazenil to enhancing cognition in down syndrome and social interaction in autism,” in *Advances in Pharmacology*, vol. 72, pp. 1–36, Elsevier, 2015.
- [75] J. Braudeau, B. Delatour, A. Duchon, P. L. Pereira, L. Dauphinot, F. De Chaumont, J. Olivo-Marin, R. Dodd, Y. Héroult, and M. Potier, “Specific targeting of the gaba-a receptor α 5 subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in down syndrome mice,” *Journal of psychopharmacology*, vol. 25, no. 8, pp. 1030–1042, 2011.
- [76] U. Rudolph and F. Knoflach, “Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of gaba a receptor subtypes,” *Nature reviews Drug discovery*, vol. 10, no. 9, p. 685, 2011.
- [77] R. Jurd, M. Arras, S. Lambert, B. Drexler, R. Siegwart, F. Crestani, M. Zaugg, K. E. Vogt, B. Ledermann, B. Antkowiak, *et al.*, “General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the gabaa receptor β 3 subunit,” *The FASEB Journal*, vol. 17, no. 2, pp. 250–252, 2003.
- [78] H. Yuan, C.-m. Low, O. a. Moody, A. Jenkins, and S. F. Traynelis, “Ionotropic GABA and Glutamate Receptor Mutations and Human Neurologic Diseases,” *Molecular pharmacology*, vol. 88, pp. 203–217, 2015.
- [79] J. C. Earnheart, C. Schweizer, F. Crestani, T. Iwasato, S. Itohara, H. Mohler, and B. Lüscher, “Gabaergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states,” *Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 14, pp. 3845–3854, 2007.
- [80] B. Luscher, Q. Shen, and N. Sahir, “The gabaergic deficit hypothesis of major depressive disorder,” *Molecular psychiatry*, vol. 16, no. 4, p. 383, 2011.
- [81] F. Crestani, M. Lorez, K. Baer, C. Essrich, D. Benke, J. P. Laurent, C. Belzung, J.-M. Fritschy, B. Lüscher, and H. Mohler, “Decreased gaba a-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues,” *Nature neuroscience*, vol. 2, no. 9, p. 833, 1999.
- [82] S. Mukherjee, S. K. Das, K. Vaidyanathan, and D. M. Vasudevan, “Consequences of alcohol consumption on neurotransmitters-an overview,” *Current neurovascular research*, vol. 5, no. 4, pp. 266–272, 2008.
- [83] D. M. Jones-Davis and R. L. Macdonald, “Gaba receptor function and pharmacology in epilepsy and status epilepticus,” *Current opinion in pharmacology*, vol. 3, no. 1, pp. 12–18, 2003.

- [84] L. J. Greenfield, “Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABA_A receptors,” *Seizure*, vol. 22, no. 8, pp. 589–600, 2013.
- [85] Y. Shangguan, X. Xu, B. Ganbat, Y. Li, W. Wang, Y. Yang, X. Lu, C. Du, X. Tian, and X. Wang, “CNTNAP4 Impacts Epilepsy Through GABAA Receptors Regulation: Evidence From Temporal Lobe Epilepsy Patients and Mouse Models,” *Cerebral Cortex*, pp. 1–14, 2017.
- [86] T.-U. Woo, R. E. Whitehead, D. S. Melchitzky, and D. A. Lewis, “A subclass of prefrontal γ -aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, no. 9, pp. 5341–5346, 1998.
- [87] A. L. Collins, D. Ma, P. L. Whitehead, E. R. Martin, H. H. Wright, R. K. Abramson, J. P. Hussman, J. L. Haines, M. L. Cuccaro, J. R. Gilbert, *et al.*, “Investigation of autism and gaba receptor subunit genes in multiple ethnic groups,” *Neurogenetics*, vol. 7, no. 3, pp. 167–174, 2006.
- [88] L. Mesbah-Oskui, A. Penna, B. A. Orser, and R. L. Horner, “Reduced expression of α_5 GABA_A receptors elicits autism-like alterations in EEG patterns and sleep-wake behavior,” *Neurotoxicology and teratology*, vol. 61, pp. 115–122, 2017.
- [89] F. Crestani and U. Rudolph, “Chapter two - behavioral functions of gabaa receptor subtypes - the zurich experience,” in *Diversity and Functions of GABA Receptors: A Tribute to Hanns Möhler, Part A* (U. Rudolph, ed.), vol. 72 of *Advances in Pharmacology*, pp. 37 – 51, Academic Press, 2015.
- [90] E. Roberts and S. Frankel, “ γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid author,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 187, pp. 55–63, 1950.
- [91] P. Krogsgaard-Larsen, G. Johnston, D. Lodge, and D. Curtis, “A new class of gaba agonist,” *Nature*, vol. 268, no. 5615, p. 53, 1977.
- [92] P. Krogsgaard-Larsen and G. Johnston, “Structure-activity studies on the inhibition of gaba binding to rat brain membranes by muscimol and related compounds,” *Journal of neurochemistry*, vol. 30, no. 6, pp. 1377–1382, 1978.
- [93] D. A. Wagner, C. Czajkowski, and M. V. Jones, “An arginine involved in gaba binding and unbinding but not gating of the gabaa receptor,” *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 11, pp. 2733–2741, 2004.
- [94] J. H. Holden and C. Czajkowski, “Different residues in the gabaa receptor $\alpha 1t60$ - $\alpha 1k70$ region mediate gaba and sr-95531 actions,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 21, pp. 18785–18792, 2002.
- [95] S. P. Venkatachalan and C. Czajkowski, “A conserved salt bridge critical for gabaa receptor function and loop c dynamics,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 36, pp. 13604–13609, 2008.
- [96] H. Mohler and T. Okada, “Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system,” *Science*, vol. 198, no. 4319, pp. 849–851, 1977.

- [97] C. Braestrup and R. F. Squires, “Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3h) diazepam binding,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 74, no. 9, pp. 3805–3809, 1977.
- [98] H. Möhler, M. Battersby, and J. Richards, “Benzodiazepine receptor protein identified and visualized in brain tissue by a photoaffinity label,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 77, no. 3, pp. 1666–1670, 1980.
- [99] P. Schoch, J. Richards, P. Häring, B. Takacs, C. Stähli, T. Staehelin, W. Haefely, and H. Möhler, “Co-localization of gabaa receptors and benzodiazepine receptors in the brain shown by monoclonal antibodies,” *Nature*, vol. 314, no. 6007, p. 168, 1985.
- [100] D. B. Pritchett, H. Sontheimer, B. D. Shivers, S. Ymer, H. Kettenmann, P. R. Schofield, and P. H. Seeburg, “Importance of a novel gabaa receptor subunit for benzodiazepine pharmacology,” *Nature*, vol. 338, no. 6216, p. 582, 1989.
- [101] S. J. Middendorp, M. C. Maldifassi, R. Baur, and E. Sigel, “Positive modulation of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors by an antagonist of the high affinity benzodiazepine binding site,” *Neuropharmacology*, vol. 95, no. May, pp. 459–67, 2015.
- [102] Z. Varagic, J. Ramerstorfer, S. Huang, S. Rallapalli, I. Sarto-Jackson, J. Cook, W. Sieghart, and M. Ernst, “Subtype selectivity of $\alpha+\beta$ - site ligands of GABAA receptors: Identification of the first highly specific positive modulators at $\alpha6\beta2/3\gamma2$ receptors,” *British Journal of Pharmacology*, vol. 169, no. 2, pp. 384–399, 2013.
- [103] R. J. Walters, S. H. Hadley, K. D. Morris, and J. Amin, “Benzodiazepines act on GABAA receptors via two distinct and separable mechanisms.,” *Nature neuroscience*, vol. 3, no. 12, pp. 1274–1281, 2000.
- [104] H. A. Wieland, H. Lüddens, and P. H. Seeburg, “A single histidine in gabaa receptors is essential for benzodiazepine agonist binding.,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 3, pp. 1426–1429, 1992.
- [105] L. H. Sternbach, “The benzodiazepine story,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 22, no. 1, pp. 1–7, 1979. PMID: 34039.
- [106] S. M. Hanson, E. V. Morlock, K. A. Satyshur, and C. Czajkowski, “Structural requirements for eszopiclone and zolpidem binding to the γ -aminobutyric acid type-a (gabaa) receptor are different,” *Journal of medicinal chemistry*, vol. 51, no. 22, pp. 7243–7252, 2008.
- [107] J. A. Teissère and C. Czajkowski, “A (beta)-strand in the (gamma)2 subunit lines the benzodiazepine binding site of the GABA A receptor: structural rearrangements detected during channel gating.,” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 21, no. 14, pp. 4977–4986, 2001.

- [108] W. Hevers and H. Lüddens, “The diversity of gabaa receptors,” *Molecular neurobiology*, vol. 18, no. 1, pp. 35–86, 1998.
- [109] J. H. Skerritt and G. A. Johnston, “Enhancement of gaba binding by benzodiazepines and related anxiolytics,” *European journal of pharmacology*, vol. 89, no. 3-4, pp. 193–198, 1983.
- [110] A. J. Boileau, A. R. Evers, A. F. Davis, and C. Czajkowski, “Mapping the agonist binding site of the gabaareceptor: Evidence for a β -strand,” *Journal of Neuroscience*, vol. 19, no. 12, pp. 4847–4854, 1999.
- [111] S. Mandrup, R. Hummel, S. Ravn, G. Jensen, P. H. Andreasen, N. Gregersen, J. Knudsen, and K. Kristiansen, “Acyl-CoA-binding protein/diazepam-binding inhibitor gene and pseudogenes. A typical housekeeping gene family,” *J. Mol. Biol.*, vol. 228, no. 3, pp. 1011–1022, 1992.
- [112] Z. Farzampour, R. J. Reimer, and J. Huguenard, “Endozepines,” *Advances in Pharmacology*, vol. 72, pp. 147–164, 2015.
- [113] A. Guidotti, C. M. Forchetti, M. G. Corda, D. Konkell, C. D. Bennett, and E. Costa, “Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 80, no. 11, pp. 3531–3535, 1983.
- [114] J. P. Taskinen, D. M. van Aalten, J. Knudsen, and R. K. Wierenga, “High resolution crystal structures of unliganded and liganded human liver acbp reveal a new mode of binding for the acyl-coa ligand,” *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 66, no. 1, pp. 229–238, 2007.
- [115] I. Mogensen, H. Schulenberg, H. Hansen, F. Spener, and J. Knudsen, “A novel acyl-coa-binding protein from bovine liver. effect on fatty acid synthesis,” *Biochemical Journal*, vol. 241, no. 1, pp. 189–192, 1987.
- [116] P. W. Gray, D. Glaister, P. H. Seeburg, A. Guidotti, and E. Costa, “Cloning and expression of cdna for human diazepam binding inhibitor, a natural ligand of an allosteric regulatory site of the gamma-aminobutyric acid type a receptor,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 83, no. 19, pp. 7547–7551, 1986.
- [117] N. J. Faergeman and J. Knudsen, “Acyl-coa binding protein is an essential protein in mammalian cell lines,” *Biochemical Journal*, vol. 368, no. 3, pp. 679–682, 2002.
- [118] I. Lihmann, J.-C. Plaquevent, H. Tostivint, R. Rajmakers, M.-C. Tonon, J. M. Conlon, and H. Vaudry, “Frog diazepam-binding inhibitor: peptide sequence, cdna cloning, and expression in the brain,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 15, pp. 6899–6903, 1994.
- [119] I. Mocchetti, R. Einstein, and J. Brosius, “Putative diazepam binding inhibitor peptide: cdna clones from rat,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 83, no. 19, pp. 7221–7225, 1986.

- [120] G. P. Owens, A. K. Sinha, J. M. Sikela, and W. E. Hahn, "Sequence and expression of the murine diazepam binding inhibitor," *Molecular Brain Research*, vol. 6, no. 2-3, pp. 101–108, 1989.
- [121] P. Ferrero, M. Santi, B. Conti-Tronconi, E. Costa, and A. Guidotti, "Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (dbi): biological activity and presence in rat brain," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 83, no. 3, pp. 827–831, 1986.
- [122] H. Alho, T. Harjuntausta, R. Schultz, M. Peltö-Huikko, and P. Bovolín, "Immunohistochemistry of diazepam binding inhibitor (dbi) in the central nervous system and peripheral organs: its possible role as an endogenous regulator of different types of benzodiazepine receptors," *Neuropharmacology*, vol. 30, no. 12, pp. 1381–1386, 1991.
- [123] H. Alho, P. Bovolín, D. Jenkins, A. Guidotti, and E. Costa, "Cellular and subcellular localization of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor: immunohistochemical studies in the rat brain.," *Journal of chemical neuroanatomy*, vol. 2, no. 6, pp. 301–318, 1989.
- [124] W. F. Loomis, M. M. Behrens, M. E. Williams, and C. Anjard, "Pregnenolone sulfate and cortisol induce secretion of acyl coa binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes," *Journal of Biological Chemistry*, pp. jbc-M110, 2010.
- [125] T. Tokay, R. Hachem, O. Masmoudi-Kouki, P. Gandolfo, L. Desrues, J. Leprince, H. Castel, M. Diaillo, M. Amri, H. Vaudry, *et al.*, "Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of n-formyl peptide receptors," *Glia*, vol. 56, no. 13, pp. 1380–1389, 2008.
- [126] C. A. Christian and J. R. Huguenard, "Astrocytes potentiate gabaergic transmission in the thalamic reticular nucleus via endozepine signaling," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, no. 50, pp. 20278–20283, 2013.
- [127] E. Slobodyansky, A. Berkovich, P. Bovolín, and C. Wambebe, "The endogenous allosteric modulation of gabaa receptor subtypes: a role for the neuronal posttranslational processing products of rat brain dbi.," *Advances in biochemical psychopharmacology*, vol. 46, pp. 51–60, 1990.
- [128] E. Costa and A. Guidotti, "Diazepam binding inhibitor (dbi): a peptide with multiple biological actions," *Life sciences*, vol. 49, no. 5, pp. 325–344, 1991.
- [129] S. Seljeset, D. P. Bright, P. Thomas, and T. G. Smart, "Probing GABA receptors with inhibitory neurosteroids," *Neuropharmacology*, pp. 1–14, 2018.
- [130] C. A. Christian, A. G. Herbert, R. L. Holt, K. Peng, K. D. Sherwood, S. Pangratz-Fuehrer, U. Rudolph, and J. R. Huguenard, "Endogenous positive allosteric modulation of gabaa receptors by diazepam binding inhibitor," *Neuron*, vol. 78, no. 6, pp. 1063–1074, 2013.

- [131] J. Alfonso, C. Le Magueresse, A. Zuccotti, K. Khodosevich, and H. Monyer, “Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal svz by reducing gaba signaling,” *Cell stem cell*, vol. 10, no. 1, pp. 76–87, 2012.
- [132] C. Ferrarese, T. Cogliati, R. Tortorella, C. Zucca, G. Bogliun, E. Beghi, D. Passoni, C. Zoia, B. Begni, L. Airoidi, *et al.*, “Diazepam binding inhibitor (dbi) in the plasma of pediatric and adult epileptic patients,” *Epilepsy research*, vol. 29, no. 2, pp. 129–134, 1998.
- [133] B. Webb and A. Sali, *Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER*. John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [134] W. R. Pearson, “Searching protein sequence libraries: Comparison of the sensitivity and selectivity of the smith-waterman and fasta algorithms,” *Genomics*, vol. 11, no. 3, pp. 635 – 650, 1991.
- [135] J. Pei and N. V. Grishin, “Promals: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins,” *Bioinformatics*, vol. 23, no. 7, pp. 802–808, 2007.
- [136] M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, and T. Schwede, “Swiss-model: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information,” *Nucleic Acids Research*, vol. 42, no. W1, pp. W252–W258, 2014.
- [137] C. Dominguez, R. Boelens, and A. Bonvin, “Haddock: a protein - protein docking approach based on biochemical or biophysical information,” *Journal of the American Chemical Society*, no. 2, pp. 1731–1737, 2003.
- [138] O. Trott and A. J. Olson, “Autodock vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 31, no. 2, pp. 455–461, 2010.
- [139] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, and R. van Drunen, “GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation,” *Computer Physics Communications*, vol. 91, no. 1-3, pp. 43–56, 1995.
- [140] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. C. Berendsen, “Gromacs: Fast, flexible, and free,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 26, no. 16, pp. 1701–1718, 2005.
- [141] S. Páll, M. J. Abraham, C. Kutzner, B. Hess, and E. Lindahl, *Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS*, pp. 3–27. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- [142] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, and K. Schulten, “Scalable molecular dynamics with namd,” *Journal of computational chemistry*, vol. 26, no. 16, pp. 1781–1802, 2005.

- [143] R. B. Russell, M. A. Saqi, R. A. Sayle, P. A. Bates, and M. J. Sternberg, "Recognition of analogous and homologous protein folds: analysis of sequence and structure conservation1," *Journal of molecular biology*, vol. 269, no. 3, pp. 423–439, 1997.
- [144] R. B. Russell and G. J. Barton, "Structural features can be unconserved in proteins with similar folds: An analysis of side-chain to side-chain contacts secondary structure and accessibility," *Journal of molecular biology*, vol. 244, no. 3, pp. 332–350, 1994.
- [145] W. R. Pearson, "An introduction to sequence similarity ("homology") searching," *Current protocols in bioinformatics*, pp. 3–1, 2013.
- [146] A. J. Ropelewski, H. B. Nicholas, and D. W. Deerfield, "Mathematically complete nucleotide and protein sequence searching using ssearch," *Current protocols in bioinformatics*, pp. 3–10, 2004.
- [147] T. Smith and M. Waterman, "Identification of common molecular subsequences.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 147, pp. 195–197, 1981.
- [148] W. R. Pearson, "Comparison of methods for searching protein sequence databases," *Protein Science*, vol. 4, no. 6, pp. 1145–1160, 1995.
- [149] D. F. Burke, C. M. Deane, H. A. Nagarajaram, N. Campillo, M. Martin-Martinez, J. Mendes, F. Molina, J. Perry, B. Reddy, C. M. Soares, *et al.*, "An iterative structure-assisted approach to sequence alignment and comparative modeling," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 37, no. S3, pp. 55–60, 1999.
- [150] J. Söding, A. Biegert, and A. N. Lupas, "The hhpred interactive server for protein homology detection and structure prediction," *Nucleic Acids Research*, vol. 33, no. *suppl_2*, pp. W244–W248, 2005.
- [151] S. Henikoff and J. G. Henikoff, "Amino acid substitution matrices from protein blocks," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 89, no. 22, pp. 10915–10919, 1992.
- [152] the UniProt Consortium, B. E. Suzek, C. H. Wu, H. Huang, P. B. McGarvey, and Y. Wang, "UniRef clusters: a comprehensive and scalable alternative for improving sequence similarity searches," *Bioinformatics*, vol. 31, pp. 926–932, 11 2014.
- [153] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman, "Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs," *Nucleic acids research*, vol. 25, no. 17, pp. 3389–3402, 1997.
- [154] L. J. McGuffin, K. Bryson, and D. T. Jones, "The psipred protein structure prediction server," *Bioinformatics*, vol. 16, no. 4, pp. 404–405, 2000.
- [155] W. Kabsch and C. Sander, "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features," *Biopolymers*, vol. 22, no. 12, pp. 2577–2637, 1983.

- [156] S. R. Eddy, “What is a hidden markov model?,” *Nature biotechnology*, vol. 22, no. 10, p. 1315, 2004.
- [157] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede, “The swiss-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling,” *Bioinformatics*, vol. 22, no. 2, pp. 195–201, 2006.
- [158] F. Kiefer, K. Arnold, M. Künzli, L. Bordoli, and T. Schwede, “The swiss-model repository and associated resources,” *Nucleic Acids Research*, vol. 37, no. suppl.1, pp. D387–D392, 2009.
- [159] C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer, and T. L. Madden, “Blast+: architecture and applications,” *BMC bioinformatics*, vol. 10, no. 1, p. 421, 2009.
- [160] M. Remmert, A. Biegert, A. Hauser, and J. Söding, “Hhblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by hmm-hmm alignment,” *Nature methods*, vol. 9, no. 2, p. 173, 2012.
- [161] E. Narayanan, W. Ben, A. Marti-Renom Marc, M. Madhusudhan, E. David, S. Min-Yi, P. Ursula, and S. Andrej, “Comparative protein structure modeling using modeller,” *Current protocols in protein science*, 2006.
- [162] A. Šali and J. P. Overington, “Derivation of rules for comparative protein modeling from a database of protein structure alignments,” *Protein Science*, vol. 3, no. 9, pp. 1582–1596, 1994.
- [163] A. D. MacKerell Jr, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack Jr, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, *et al.*, “All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins,” *The journal of physical chemistry B*, vol. 102, no. 18, pp. 3586–3616, 1998.
- [164] W. Braun and N. Gö, “Calculation of protein conformations by proton-proton distance constraints: A new efficient algorithm,” *Journal of molecular biology*, vol. 186, no. 3, pp. 611–626, 1985.
- [165] A. K. e. Erik R. Lindahl (auth.), *Molecular Modeling of Proteins*. Methods Molecular Biology 443, Humana Press, 1 ed., 2008.
- [166] M. Trellet, A. S. J. Melquiond, and A. M. J. J. Bonvin, “A unified conformational selection and induced fit approach to protein-peptide docking,” *PLOS ONE*, vol. 8, pp. 1–13, 03 2013.
- [167] R. Rentzsch and B. Y. Renard, “Docking small peptides remains a great challenge: an assessment using autodock vina,” *Briefings in Bioinformatics*, vol. 16, no. 6, pp. 1045–1056, 2015.
- [168] P. I. Koukos, I. Faro, C. W. van Noort, and A. M. Bonvin, “A membrane protein complex docking benchmark,” *Journal of molecular biology*, 2018.
- [169] J. D. Head and M. C. Zerner, “A broyden—fletcher—goldfarb—shanno optimization procedure for molecular geometries,” *Chemical physics letters*, vol. 122, no. 3, pp. 264–270, 1985.
- [170] G. C. P. Van Zundert, J. P. G. L. M. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P. L. Kastritis, E. Karaca, A. S. J. Melquiond, M. Van Dijk, S. J. De Vries, and A. M. J. J. Bonvin, “The haddock2.2 web server: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 428, no. 4, pp. 720–725, 2016.

- [171] J. P. G. L. M. Rodrigues, A. S. J. Melquiond, E. Karaca, M. Trellet, M. van Dijk, G. C. P. van Zundert, C. Schmitz, S. J. de Vries, A. Bordogna, L. Bonati, P. L. Kastiris, and A. M. J. J. Bonvin, “Defining the limits of homology modeling in information-driven protein docking,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 81, no. 12, pp. 2119–2128, 2013.
- [172] A. Bordogna, A. Pandini, and L. Bonati, “Predicting the accuracy of protein–ligand docking on homology models,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 32, no. 1, pp. 81–98, 2011.
- [173] C. Oostenbrink, A. Villa, A. E. Mark, and W. F. Van Gunsteren, “A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1656–1676, 2004.
- [174] J. W. Ponder and D. A. Case, “FORCE FIELDS FOR PROTEIN SIMULATIONS,” *Advances in Protein Chemistry*, vol. 66, pp. 27–85, 2003.
- [175] L. Darré, M. R. Machado, A. F. Brandner, H. C. González, S. Ferreira, and S. Pantano, “Sirah: a structurally unbiased coarse-grained force field for proteins with aqueous solvation and long-range electrostatics,” *Journal of chemical theory and computation*, vol. 11, no. 2, pp. 723–739, 2015.
- [176] E. E. Barrera, E. N. Frigini, R. D. Porasso, and S. Pantano, “Modeling dmpc lipid membranes with sirah force-field,” *Journal of molecular modeling*, vol. 23, no. 9, p. 259, 2017.
- [177] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, and J. Hermans, *Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration*, pp. 331–342. Dordrecht: Springer Netherlands, 1981.
- [178] L. Darré, M. R. Machado, P. D. Dans, F. E. Herrera, and S. Pantano, “Another coarse grain model for aqueous solvation: Wat four?,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 6, no. 12, pp. 3793–3807, 2010.
- [179] A. R. Leach, *Molecular modelling: principles and applications*. Pearson education, 2001.
- [180] L. Verlet, “Computer experiments on classical fluids. i. thermodynamical properties of lennard-jones molecules,” *Physical review*, vol. 159, no. 1, p. 98, 1967.
- [181] R. W. Hockney and J. W. Eastwood, *Computer simulation using particles*. crc Press, 1988.
- [182] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H. J. Berendsen, “Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes,” *Journal of Computational Physics*, vol. 23, no. 3, pp. 327–341, 1977.
- [183] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, and J. G. E. M. Fraaije, “LINCS : A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations,” *Journal of Computational Chemistry*, vol. 18, no. 12, pp. 1463–1472, 1997.
- [184] S. Páll and B. Hess, “A flexible algorithm for calculating pair interactions on simd architectures,” *Computer Physics Communications*, vol. 184, no. 12, pp. 2641 – 2650, 2013.

- [185] T. Darden, D. York, L. Pedersen, T. Darden, D. York, and L. Pedersen, “Particle mesh Ewald : An Nlog (N) method for Ewald sums in large systems,” *The Journal of chemical physics*, vol. 98, no. 12, pp. 10089–10092, 1993.
- [186] T. I. Cheatham, J. Miller, T. Fox, T. Darden, and P. Kollman, “Molecular dynamics simulations on solvated biomolecular systems: the particle mesh ewald method leads to stable trajectories of dna, rna, and proteins,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 117, no. 14, pp. 4193–4194, 1995.
- [187] H. J. C. Berendsen, J. P. M. van Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak, “Molecular dynamics with coupling to an external bath,” *The Journal of chemical physics*, vol. 81, no. 8, pp. 3684–3690, 1984.
- [188] G. Bussi, D. Donadio, and M. Parrinello, “Canonical sampling through velocity rescaling,” *The Journal of chemical physics*, vol. 126, no. 1, p. 014101, 2007.
- [189] S. Nosé, “A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble,” *Molecular physics*, vol. 52, no. 2, pp. 255–268, 1984.
- [190] W. G. Hoover, “Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions,” *Phys. Rev. A*, vol. 31, pp. 1695–1697, mar 1985.
- [191] T. Schneider and E. Stoll, “Molecular-dynamics study of a three-dimensional one-component model for distortive phase transitions,” *Physical Review B*, vol. 17, no. 3, p. 1302, 1978.
- [192] M. Parrinello and A. Rahman, “Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method,” *Journal of Applied physics*, vol. 52, no. 12, pp. 7182–7190, 1981.
- [193] G. J. Martyna, D. J. Tobias, and M. L. Klein, “Constant pressure molecular dynamics algorithms,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 101, no. 5, pp. 4177–4189, 1994.
- [194] D. Frenkel and B. Smit, *Understanding molecular simulation: from algorithms to applications*, vol. 1. Elsevier, 2001.
- [195] G. Bussi and M. Parrinello, “Stochastic thermostats: comparison of local and global schemes,” *Computer Physics Communications*, vol. 179, no. 1-3, pp. 26–29, 2008.
- [196] S. E. Feller, Y. Zhang, R. W. Pastor, and B. R. Brooks, “Constant pressure molecular dynamics simulation: the langevin piston method,” *The Journal of chemical physics*, vol. 103, no. 11, pp. 4613–4621, 1995.
- [197] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, “VMD – Visual Molecular Dynamics,” *Journal of Molecular Graphics*, vol. 14, pp. 33–38, 1996.
- [198] J. Stone, “*An Efficient Library for Parallel Ray Tracing and Animation*,” Master’s thesis, Computer Science Department, University of Missouri-Rolla, April 1998.

- [199] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, “Ucsf chimera—a visualization system for exploratory research and analysis,” *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004.
- [200] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, and K. Cowtan, “Features and development of coot,” *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography*, vol. 66, pp. 486–501, 2010.
- [201] V. B. Chen, W. B. Arendall, III, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, and D. C. Richardson, “*MolProbity*: all-atom structure validation for macromolecular crystallography,” *Acta Crystallographica Section D*, vol. 66, pp. 12–21, Jan 2010.
- [202] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, and J. M. Thornton, “PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures,” *Journal of Applied Crystallography*, vol. 26, no. 2, pp. 283–291, 1993.
- [203] P. Benkert, S. C. E. Tosatto, and D. Schomburg, “Qmean: A comprehensive scoring function for model quality assessment,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 71, no. 1, pp. 261–277, 2008.
- [204] G. T. Ramachandran and V. Sasisekharan, “Conformation of polypeptides and proteins,” in *Advances in protein chemistry*, vol. 23, pp. 283–437, Elsevier, 1968.
- [205] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Arendall III, P. I. De Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson, and D. C. Richardson, “Structure validation by $c\alpha$ geometry: ϕ , ψ and $c\beta$ deviation,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 50, no. 3, pp. 437–450, 2003.
- [206] R. A. Engh and R. Huber, “Accurate bond and angle parameters for x-ray protein structure refinement,” *Acta Crystallographica Section A*, vol. 47, no. 4, pp. 392–400, 1991.
- [207] W. Mendenhall and T. Sincich, *Statistics for Engineering and the Sciences*. Prentice-Hall international editions, Prentice-Hall, 1995.
- [208] K. B. Koziara, M. Stroet, A. K. Malde, and A. E. Mark, “Testing and validation of the automated topology builder (atb) version 2.0: prediction of hydration free enthalpies,” *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, vol. 28, no. 3, pp. 221–233, 2014.
- [209] A. W. S. da Silva and W. F. Vranken, “Acypype-antechamber python parser interface,” *BMC research notes*, vol. 5, no. 1, p. 367, 2012.
- [210] A. W. Schüttelkopf and D. M. F. van Aalten, “Prodrgr: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes,” *Acta Crystallogr.*, vol. D60, pp. 1355–1363, 2004.
- [211] J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, and D. A. Case, “Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations,” *Journal of molecular graphics and modelling*, vol. 25, no. 2, pp. 247–260, 2006.

- [212] J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, and D. A. Case, “Antechamber: an accessory software package for molecular mechanical calculations,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 222, p. U403, 2001.
- [213] F. Tama and Y.-H. Sanejouand, “Conformational change of proteins arising from normal mode calculations,” *Protein engineering*, vol. 14, no. 1, pp. 1–6, 2001.
- [214] W. G. Krebs, V. Alexandrov, C. A. Wilson, N. Echols, H. Yu, and M. Gerstein, “Normal mode analysis of macromolecular motions in a database framework: developing mode concentration as a useful classifying statistic,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 48, no. 4, pp. 682–695, 2002.
- [215] K. Suhre and Y.-H. Sanejouand, “Elnemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement,” *Nucleic acids research*, vol. 32, no. suppl_2, pp. W610–W614, 2004.
- [216] A. Barducci, M. Bonomi, and M. Parrinello, “Metadynamics,” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, vol. 1, no. 5, pp. 826–843, 2011.
- [217] W. L. Jorgensen and C. Ravimohan, “Monte carlo simulation of differences in free energies of hydration,” *The Journal of chemical physics*, vol. 83, no. 6, pp. 3050–3054, 1985.
- [218] C. Chipot and A. Pohorille, *Free energy calculations*. Springer, 2007.
- [219] J. Comer, J. C. Gumbart, J. Hénin, T. Lelièvre, A. Pohorille, and C. Chipot, “The adaptive biasing force method: Everything you always wanted to know but were afraid to ask,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 119, no. 3, pp. 1129–1151, 2014.
- [220] A. D. McNaught and A. D. McNaught, *Compendium of chemical terminology*, vol. 1669. Blackwell Science Oxford, 1997.
- [221] W. K. den Otter and W. J. Briels, “The calculation of free-energy differences by constrained molecular-dynamics simulations,” *The Journal of chemical physics*, vol. 109, no. 11, pp. 4139–4146, 1998.
- [222] E. Darve, D. Rodríguez-Gómez, and A. Pohorille, “Adaptive biasing force method for scalar and vector free energy calculations,” *The Journal of chemical physics*, vol. 128, no. 14, p. 144120, 2008.
- [223] T. U. Consortium, “Uniprot: the universal protein knowledgebase,” *Nucleic Acids Research*, vol. 45, no. D1, pp. D158–D169, 2017.
- [224] M. Shen and A. Sali, “Statistical potential for assessment and prediction of protein structures,” *Protein Science*, vol. 15, no. 11, pp. 2507–2524, 2006.
- [225] M. Rostkowski, M. H. M. Olsson, C. R. Søndergaard, and J. H. Jensen, “Graphical analysis of pH-dependent properties of proteins predicted using PROPKA,” *BMC structural biology*, vol. 11, p. 6, jan 2011.

- [226] C. R. Søndergaard, M. H. Olsson, M. Rostkowski, and J. H. Jensen, “Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of p k a values,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 7, no. 7, pp. 2284–2295, 2011.
- [227] M. H. Olsson, C. R. Søndergaard, M. Rostkowski, and J. H. Jensen, “Propka3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical p k a predictions,” *Journal of chemical theory and computation*, vol. 7, no. 2, pp. 525–537, 2011.
- [228] M. M. Ghahremanpour, S. S. Arab, S. B. Aghazadeh, J. Zhang, and D. van der Spoel, “Membuilder: a web-based graphical interface to build heterogeneously mixed membrane bilayers for the gromacs biomolecular simulation program,” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 3, pp. 439–441, 2014.
- [229] J. Hénin, R. Salari, S. Murlidaran, and G. Brannigan, “A predicted binding site for cholesterol on the GABAA receptor,” *Biophysical Journal*, vol. 106, no. 9, pp. 1938–1949, 2014.
- [230] L. Chiodo, T. E. Malliavin, L. Maragliano, G. Cottone, and G. Ciccotti, “A structural model of the human $\alpha 7$ nicotinic receptor in an open conformation,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 7, pp. 1–30, 2015.
- [231] O. Berger, O. Edholm, and F. Jähnig, “Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature,” *Biophysical journal*, vol. 72, no. 5, pp. 2002–2013, 1997.
- [232] M. R. Machado and S. Pantano, “Sirah tools: mapping, backmapping and visualization of coarse-grained models,” *Bioinformatics*, vol. 32, no. 10, pp. 1568–1570, 2016.
- [233] L. W. Wong, H. S. Tae, and B. A. Cromer, “Assembly, trafficking and function of $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA receptors are regulated by N-terminal regions, in a subunit-specific manner,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 134, no. 5, pp. 819–832, 2015.
- [234] O. S. Smart, J. G. Neduvélil, X. Wang, B. Wallace, and M. S. Sansom, “Hole: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models,” *Journal of molecular graphics*, vol. 14, no. 6, pp. 354–360, 1996.
- [235] A. Bondi, “van der waals volumes and radii,” *The Journal of physical chemistry*, vol. 68, no. 3, pp. 441–451, 1964.
- [236] R. W. Olsen, “Allosteric ligands and their binding sites define γ -aminobutyric acid (gaba) type a receptor subtypes,” in *Advances in Pharmacology*, vol. 73, pp. 167–202, Elsevier, 2015.
- [237] E. Krissinel and K. Henrick, “Protein interfaces, surfaces and assemblies service pisa at european bioinformatics institute,” *J Mol Biol*, vol. 372, pp. 774–797, 2007.
- [238] N. Kučerka, M.-P. Nieh, and J. Katsaras, “Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1808, no. 11, pp. 2761 – 2771, 2011.

- [239] A. Khatri, A. Sedelnikova, and D. S. Weiss, “Structural rearrangements in loop f of the gaba receptor signal ligand binding, not channel activation,” *Biophysical journal*, vol. 96, no. 1, pp. 45–55, 2009.
- [240] J. G. Newell and C. Czajkowski, “The gabaa receptor $\alpha 1$ subunit pro174–asp191 segment is involved in gaba binding and channel gating,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 15, pp. 13166–13172, 2003.
- [241] V. Raghavan, P. Bollmann, and G. S. Jung, “A critical investigation of recall and precision as measures of retrieval system performance,” *ACM Transactions on Information Systems (TOIS)*, vol. 7, no. 3, pp. 205–229, 1989.
- [242] J. Davis and M. Goadrich, “The relationship between precision-recall and roc curves,” in *Proceedings of the 23rd international conference on Machine learning*, pp. 233–240, ACM, 2006.
- [243] F. Fierro, E. Suku, M. Alfonso-Prieto, A. Giorgetti, S. Cichon, and P. Carloni, “Agonist binding to chemosensory receptors: A systematic bioinformatics analysis,” *Frontiers in molecular biosciences*, vol. 4, p. 63, 2017.
- [244] C. Goutte and E. Gaussier, “A probabilistic interpretation of precision, recall and f-score, with implication for evaluation,” in *European Conference on Information Retrieval*, pp. 345–359, Springer, 2005.
- [245] T. Saito and M. Rehmsmeier, “The precision-recall plot is more informative than the roc plot when evaluating binary classifiers on imbalanced datasets,” *PLoS one*, vol. 10, no. 3, p. e0118432, 2015.
- [246] J. Boström, A. Hogner, and S. Schmitt, “Do structurally similar ligands bind in a similar fashion?,” *Journal of medicinal chemistry*, vol. 49, no. 23, pp. 6716–6725, 2006.
- [247] G. Maggiora, M. Vogt, D. Stumpfe, and J. Bajorath, “Molecular similarity in medicinal chemistry,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 57, no. 8, pp. 3186–3204, 2014. PMID: 24151987.
- [248] N. M. O’Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, and G. R. Hutchison, “Open babel: An open chemical toolbox,” *Journal of cheminformatics*, vol. 3, no. 1, p. 33, 2011.
- [249] “The open babel package, version 2.4.1,” 2016.
- [250] P. C. Lai, M. S. Singer, and C. J. Crasto, “Structural activation pathways from dynamic olfactory receptor–odorant interactions,” *Chemical senses*, vol. 30, no. 9, pp. 781–792, 2005.
- [251] L. Gelis, S. Wolf, H. Hatt, E. M. Neuhaus, and K. Gerwert, “Prediction of a ligand-binding niche within a human olfactory receptor by combining site-directed mutagenesis with dynamic homology modeling,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 51, no. 5, pp. 1274–1278, 2012.
- [252] A. K. Malde, L. Zuo, M. Breeze, M. Stroet, D. Poger, P. C. Nair, C. Oostenbrink, and A. E. Mark, “An automated force field topology builder (atb) and repository: version 1.0,” *Journal of chemical theory and computation*, vol. 7, no. 12, pp. 4026–4037, 2011.

- [253] L. Kalé, R. Skeel, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gursoy, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinozaki, K. Varadarajan, and K. Schulten, “Namd2: greater scalability for parallel molecular dynamics,” *Journal of Computational Physics*, vol. 151, no. 1, pp. 283–312, 1999.
- [254] Theoretical, C. B. G. in the Beckman Institute for Advanced Science, and T. at the University of Illinois at Urbana-Champaign, “Namd 2.12,” 2016.
- [255] J. Hénin, G. Fiorin, C. Chipot, and M. L. Klein, “Exploring multidimensional free energy landscapes using time-dependent biases on collective variables,” *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 6, no. 1, pp. 35–47, 2010. PMID: 26614317.
- [256] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case, “Development and testing of a general amber force field,” *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 9, pp. 1157–1174, 2004.
- [257] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, “Comparison of simple potential functions for simulating liquid water,” *The Journal of chemical physics*, vol. 79, no. 2, pp. 926–935, 1983.
- [258] C.-G. Wermuth, C. Ganellin, P. Lindberg, and L. Mitscher, “Glossary of terms used in medicinal chemistry (iupac recommendations 1998),” *Pure and applied Chemistry*, vol. 70, no. 5, pp. 1129–1143, 1998.
- [259] T. Clayton, J. Chen, M. Ernst, L. Richter, B. Cromer, C. Morton, H. Ng, C. Kaczorowski, F. Helms-tetter, R. Furtmuller, *et al.*, “An updated unified pharmacophore model of the benzodiazepine binding site on γ -aminobutyric acid receptors: correlation with comparative models,” *Current medicinal chemistry*, vol. 14, no. 26, pp. 2755–2775, 2007.
- [260] L. L. Duncalfe, M. R. Carpenter, L. B. Smillie, I. L. Martin, and S. M. Dunn, “The major site of photoaffinity labeling of the-aminobutyric acid type a receptor by hflunitrazepam is histidine 102 of the subunit,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 16, pp. 9209–9214, 1996.
- [261] H. A. Favre and W. H. Powell, *Nomenclature of organic chemistry: IUPAC recommendations and preferred names 2013*. Royal Society of Chemistry, 2013.
- [262] H. Alonso, A. A. Bliznyuk, and J. E. Gready, “Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design,” *Medicinal research reviews*, vol. 26, no. 5, pp. 531–568, 2006.
- [263] K. R. Tan, R. Baur, S. Charon, M. Goeldner, and E. Sigel, “Relative positioning of diazepam in the benzodiazepine-binding-pocket of gabaa receptors,” *Journal of neurochemistry*, vol. 111, no. 5, pp. 1264–1273, 2009.
- [264] D. Berezhnoy, T. T. Gibbs, and D. H. Farb, “Docking of 1, 4-benzodiazepines in the $\alpha 1/\gamma 2$ gabaa receptor modulator site,” *Molecular pharmacology*, vol. 76, no. 2, pp. 440–450, 2009.

- [265] S. J. Middendorp, E. Hurni, M. Schonberger, M. Stein, M. Pangerl, D. Trauner, and E. Sigel, "Relative positioning of classical benzodiazepines to the $\gamma 2$ -subunit of gabaa receptors," *ACS chemical biology*, vol. 9, no. 8, pp. 1846–1853, 2014.
- [266] L. Richter, C. De Graaf, W. Sieghart, Z. Varagic, M. Mörzinger, I. J. De Esch, G. F. Ecker, and M. Ernst, "Diazepam-bound gaba a receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands," *Nature chemical biology*, vol. 8, no. 5, p. 455, 2012.
- [267] R. Spurny, J. Ramerstorfer, K. Price, M. Brams, M. Ernst, H. Nury, M. Verheij, P. Legrand, D. Bertrand, S. Bertrand, *et al.*, "Pentameric ligand-gated ion channel elic is activated by gaba and modulated by benzodiazepines," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 44, pp. E3028–E3034, 2012.
- [268] G. W. Sawyer, D. C. Chiara, R. W. Olsen, and J. B. Cohen, "Identification of the bovine γ -aminobutyric acid type a receptor α subunit residues photolabeled by the imidazobenzodiazepine [3h] ro15-4513," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 51, pp. 50036–50045, 2002.
- [269] A. M. Kucken, J. A. Teissère, J. Seffinga-Clark, D. A. Wagner, and C. Czajkowski, "Structural requirements for imidazobenzodiazepine binding to gabaa receptors," *Molecular pharmacology*, vol. 63, no. 2, pp. 289–296, 2003.
- [270] K. R. Tan, A. Gonthier, R. Baur, M. Ernst, M. Goeldner, and E. Sigel, "Proximity-accelerated chemical coupling reaction in the benzodiazepine-binding site of γ -aminobutyric acid type a receptors superposition of different allosteric modulators," *Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 36, pp. 26316–26325, 2007.
- [271] T. H. Chiu and H. C. Rosenberg, "Gaba receptor-mediated modulation of 3h-diazepam binding in rat cortex," *European journal of pharmacology*, vol. 56, no. 4, pp. 337–345, 1979.
- [272] H.-B. Xie, Y. Sha, J. Wang, and M.-S. Cheng, "Some insights into the binding mechanism of the gaba a receptor: a combined docking and mm-gbsa study," *Journal of molecular modeling*, vol. 19, no. 12, pp. 5489–5500, 2013.
- [273] N. W. Gilman, P. Rosen, J. V. Earley, C. Cook, and L. J. Todaro, "Atropisomers of 1,4-benzodiazepines. synthesis and resolution of a diazepam-related 1,4-benzodiazepine," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 112, no. 10, pp. 3969–3978, 1990.
- [274] N. W. Gilman, P. Rosen, J. V. Earley, C. M. Cook, J. F. Blount, and L. J. Todaro, "Atropisomers of 1,4-benzodiazepines. 2. synthesis and resolution of imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepines," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 58, no. 12, pp. 3285–3298, 1993.
- [275] P. Salvadori, C. Bertucci, G. Ascoli, G. Uccello-Barretta, and E. Rossi, "Direct resolution, characterization, and stereospecific binding properties of an atropisomeric 1,4-benzodiazepine," *Chirality*, vol. 9, no. 5-6, pp. 495–505, 1997.

- [276] S. M. Hanson and C. Czajkowski, “Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the gabaa receptor,” *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 13, pp. 3490–3499, 2008.
- [277] E. Sigel, M. T. Schaerer, A. Buhr, and R. Baur, “The benzodiazepine binding pocket of recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ γ -aminobutyric acid receptors: Relative orientation of ligands and amino acid side chains,” *Molecular pharmacology*, vol. 54, no. 6, pp. 1097–1105, 1998.
- [278] N. London, B. Raveh, E. Cohen, G. Fathi, and O. Schueler-Furman, “Rosetta flexpepdock web server—high resolution modeling of peptide–protein interactions,” *Nucleic acids research*, vol. 39, no. suppl_2, pp. W249–W253, 2011.
- [279] B. Raveh, N. London, and O. Schueler-Furman, “Sub-angstrom modeling of complexes between flexible peptides and globular proteins,” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 78, no. 9, pp. 2029–2040, 2010.
- [280] L. C. Xue, J. P. Rodrigues, P. L. Kastritis, A. M. Bonvin, and A. Vangone, “Prodigy: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes,” *Bioinformatics*, vol. 32, no. 23, pp. 3676–3678, 2016.
- [281] N. Schneider, G. Lange, S. Hindle, R. Klein, and M. Rarey, “A consistent description of hydrogen bond and dehydration energies in protein–ligand complexes: methods behind the hyde scoring function,” *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 27, no. 1, pp. 15–29, 2013.
- [282] A. Berkovich, P. McPhie, M. Campagnone, A. Guidotti, and P. Hensley, “Product of Rat Diazepam Binding Inhibitor , Triakontatetrapeptide (Diazepam Binding Inhibitor 17-50) Contains an α -Helix , Which Allows Discrimination between Benzodiazepine Binding Site Subtypes,” *Molecular Pharmacology*, vol. 37, pp. 164–172, 1989.
- [283] Z. Lin, W. F. Van Gunsteren, and H. Liu, “Conformational state-specific free energy differences by one-step perturbation: Protein secondary structure preferences of the gromos 43a1 and 53a6 force fields,” *Journal of computational chemistry*, vol. 32, no. 10, pp. 2290–2297, 2011.
- [284] M. Musgaard, T. Paramo, L. Domicevica, O. J. Andersen, and P. C. Biggin, “Insights into channel dysfunction from modelling and molecular dynamics simulations,” *Neuropharmacology*, vol. 132, pp. 20–30, 2018.
- [285] A. Tolk, S. Y. Diallo, J. J. Padilla, and R. Gore, “Epistemology of modeling and simulation: How can we gain knowledge from simulations?,” *arXiv preprint arXiv:1306.5215*, 2013.
- [286] E. Winsberg, “Computer simulations in science,” 2013.
- [287] F. Dyszy, A. P. A. Pinto, A. P. U. Araújo, and A. J. Costa-Filho, “Probing the interaction of brain fatty acid binding protein (b-fabp) with model membranes,” *PLOS ONE*, vol. 8, pp. 1–11, 03 2013.

- [288] J. P. Klare, "Site-directed spin labeling epr spectroscopy in protein research," *Biological chemistry*, vol. 394, no. 10, pp. 1281–1300, 2013.
- [289] C. L. Padgett, A. P. Hanek, H. A. Lester, D. A. Dougherty, and S. C. Lummis, "Unnatural amino acid mutagenesis of the gabaa receptor binding site residues reveals a novel cation- π interaction between gaba and β 2tyr97," *Journal of Neuroscience*, vol. 27, no. 4, pp. 886–892, 2007.
- [290] A. J. Boileau, J. G. Newell, and C. Czajkowski, "Gabaa receptor β 2tyr97 and leu99 line the gaba-binding site insights into mechanisms of agonist and antagonist actions," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 4, pp. 2931–2937, 2002.
- [291] J. G. Newell, R. A. McDevitt, and C. Czajkowski, "Mutation of glutamate 155 of the gabaa receptor β 2 subunit produces a spontaneously open channel: a trigger for channel activation," *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 50, pp. 11226–11235, 2004.
- [292] J. Amin and D. S. Weiss, "Gabaa receptor needs two homologous domains of the β -subunit for activation by gaba but not by pentobarbital," *Nature*, vol. 366, no. 6455, pp. 565–569, 1993.
- [293] D. A. Wagner and C. Czajkowski, "Structure and dynamics of the gaba binding pocket: a narrowing cleft that constricts during activation," *Journal of Neuroscience*, vol. 21, no. 1, pp. 67–74, 2001.
- [294] M. P. Goldschen-Ohm, D. A. Wagner, and M. V. Jones, "Three arginines in the gabaa receptor binding pocket have distinct roles in the formation and stability of agonist-versus antagonist-bound complexes," *Molecular pharmacology*, vol. 80, no. 4, pp. 647–656, 2011.
- [295] G. B. Smith and R. W. Olsen, "Identification of a [3h] muscimol photoaffinity substrate in the bovine gamma-aminobutyric acid receptor alpha subunit," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 32, pp. 20380–20387, 1994.
- [296] J. H. Kloda and C. Czajkowski, "Agonist-, antagonist-, and benzodiazepine-induced structural changes in the α 1 met113-leu132 region of the gabaa receptor," *Molecular pharmacology*, vol. 71, no. 2, pp. 483–493, 2007.
- [297] S. E. Westh-Hansen, M. R. Witt, K. Dekermendjian, T. Liljefors, P. B. Rasmussen, and M. Nielsen, "Arginine residue 120 of the human gabaa receptor α 1, subunit is essential for gaba binding and chloride ion current gating," *Neuroreport*, vol. 10, no. 11, pp. 2417–2421, 1999.
- [298] S. E. Westh-Hansen, P. B. Rasmussen, S. Hastrup, J. Nabekura, K. Noguchi, N. Akaike, M.-R. Witt, and M. Nielsen, "Decreased agonist sensitivity of human gabaa receptors by an amino acid variant, isoleucine to valine, in the α 1 subunit," *European journal of pharmacology*, vol. 329, no. 2-3, pp. 253–257, 1997.

- [299] E. V. Morlock and C. Czajkowski, "Different residues in the gabaa receptor benzodiazepine binding pocket mediate benzodiazepine efficacy and binding," *Molecular pharmacology*, vol. 80, no. 1, pp. 14–22, 2011.
- [300] K. R. Tan, R. Baur, A. Gonthier, M. Goeldner, and E. Sigel, "Two neighboring residues of loop a of the $\alpha 1$ subunit point towards the benzodiazepine binding site of gabaa receptors," *FEBS letters*, vol. 581, no. 24, pp. 4718–4722, 2007.
- [301] D. Berezhnoy, Y. Nyfeler, A. Gonthier, H. Schwob, M. Goeldner, and E. Sigel, "On the benzodiazepine binding pocket in gabaa receptors," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 5, pp. 3160–3168, 2004.
- [302] H. A. Wieland and H. Lüddens, "Four amino acid exchanges convert a diazepam-insensitive, inverse agonist-preferring gabaa receptor into a diazepam-preferring gabaa receptor," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 37, no. 26, pp. 4576–4580, 1994.
- [303] M. Davies, J. G. Newell, J. M. Derry, I. L. Martin, and S. M. Dunn, "Characterization of the interaction of zopiclone with γ -aminobutyric acid type a receptors," *Molecular pharmacology*, vol. 58, no. 4, pp. 756–762, 2000.
- [304] J. A. Benson, K. Löw, R. Keist, H. Mohler, and U. Rudolph, "Pharmacology of recombinant γ -aminobutyric acid receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated α -subunits," *FEBS letters*, vol. 431, no. 3, pp. 400–404, 1998.
- [305] J. Amin, A. Brooks-Kayal, and D. S. Weiss, "Two tyrosine residues on the α subunit are crucial for benzodiazepine binding and allosteric modulation of γ -aminobutyric acid receptors," *Molecular Pharmacology*, vol. 51, no. 5, pp. 833–841, 1997.
- [306] A. Buhr, R. Baur, P. Malherbe, and E. Sigel, "Point mutations of the alpha 1 beta 2 gamma 2 gamma-aminobutyric acid (a) receptor affecting modulation of the channel by ligands of the benzodiazepine binding site.," *Molecular pharmacology*, vol. 49, no. 6, pp. 1080–1084, 1996.
- [307] D. B. Pritchett and P. H. Seeburg, "gamma-aminobutyric acid type a receptor point mutation increases the affinity of compounds for the benzodiazepine site.," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 88, no. 4, pp. 1421–1425, 1991.
- [308] M. T. Schaerer, A. Buhr, R. Baur, and E. Sigel, "Amino acid residue 200 on the $\alpha 1$ subunit of gabaa receptors affects the interaction with selected benzodiazepine binding site ligands," *European journal of pharmacology*, vol. 354, no. 2-3, pp. 283–287, 1998.
- [309] J. Derry, S. M. Dunn, and M. Davies, "Identification of a residue in the γ -aminobutyric acid type a receptor α subunit that differentially affects diazepam-sensitive and-insensitive benzodiazepine site binding," *Journal of neurochemistry*, vol. 88, no. 6, pp. 1431–1438, 2004.

- [310] A. Buhr, M. T. Schaerer, R. Baur, and E. Sigel, "Residues at positions 206 and 209 of the $\alpha 1$ subunit of γ -aminobutyric acid receptors influence affinities for benzodiazepine binding site ligands," *Molecular pharmacology*, vol. 52, no. 4, pp. 676–682, 1997.
- [311] A. M. Kucken, D. A. Wagner, P. R. Ward, J. A. Teissère, A. J. Boileau, and C. Czajkowski, "Identification of benzodiazepine binding site residues in the $\gamma 2$ subunit of the γ -aminobutyric acid receptor," *Molecular Pharmacology*, vol. 57, no. 5, pp. 932–939, 2000.
- [312] A. Buhr and E. Sigel, "A point mutation in the $\gamma 2$ subunit of γ -aminobutyric acid type a receptors results in altered benzodiazepine binding site specificity," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 16, pp. 8824–8829, 1997.
- [313] P. B. Wingrove, S. A. Thompson, K. A. Wafford, and P. J. Whiting, "Key amino acids in the γ subunit of the γ -aminobutyric acid receptor that determine ligand binding and modulation at the benzodiazepine site," *Molecular Pharmacology*, vol. 52, no. 5, pp. 874–881, 1997.
- [314] A. Buhr, R. Baur, and E. Sigel, "Subtle changes in residue 77 of the γ subunit of $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ gabaa receptors drastically alter the affinity for ligands of the benzodiazepine binding site," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 18, pp. 11799–11804, 1997.
- [315] S. J. Mihic, P. J. Whiting, R. L. Klein, K. A. Wafford, and R. A. Harris, "A single amino acid of the human gamma-aminobutyric acid type a receptor gamma 2 subunit determines benzodiazepine efficacy.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 52, pp. 32768–32773, 1994.

Publicaciones

1. Zamarreño, F., Giorgetti, A., **Amundarain, M. J.**, Viso, J. F., Córscico, B., y Costabel, M. D. (2018). Conserved charged amino acids are key determinants for fatty acid binding proteins (FABPs)-membrane interactions. A multi-methodological computational approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 36(4), 861-877. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1301271>
2. **Amundarain, M. J.**, Viso, J. F., Zamarreño, F., Giorgetti, A., y Costabel, M. (2018). Orthosteric and benzodiazepine cavities of the $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABAA receptor: insights from experimentally validated in silico methods. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37(6)1597–1615. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1462733>
3. Viso, J. F., Belelli, P., Machado, M., González, H., Pantano, S., **Amundarain, M. J.**, ... & Costabel, M. D. (2018). Multiscale modelization in a small virus: Mechanism of proton channeling and its role in triggering capsid disassembly. *PLoS computational biology*, 14(4), e1006082. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006082>
4. **Amundarain, M. J.**, Ribeiro, R. P., Costabel, M.D. y Giorgetti, A. (2019). GABA_A receptor family: Overview on structural characterisation. *Future Medicinal Chemistry*, 11(3), 229 – 245, doi: 10.4155/fmc-2018-0336.