



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Facultad de Ciencia y Tecnología

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Química

**MODELADO MOLECULAR DEL RECEPTOR DEL
GUSTO AMARGO TAS2R16 Y SU UNIÓN A
COMPUESTOS DE INTERÉS**

~

**MOLECULAR MODELING OF THE BITTER TASTE
RECEPTOR TAS2R16 AND ITS BINDING TO
COMPOUNDS OF INTEREST**

Realizado por:

Carmen Fernández Bujanda

Tutelado por:

María Purificación Fernández Zurbano

Juan Fernández Recio

Logroño, Junio, 2020

RESUMEN

Las preferencias alimentarias tienen una gran relevancia no solo en sectores socioeconómicos como la industria alimentaria y la vitivinícola, sino también en la salud humana, y dependen de factores culturales, sociológicos, nutricionales y genéticos. Estos últimos, se encuentran directamente relacionados con el grado de percepción de los sabores influenciando la nutrición y la predisposición de los individuos a ciertas enfermedades. Algunos alimentos presentan sustancias tóxicas que generan un sabor amargo, y las personas que no perciben el sabor amargo tienen mayor tendencia a ingerir alimentos que poseen estos compuestos y a acumular toxinas en el organismo, haciéndolos más propensos a contraer enfermedades relacionadas con la disfunción tiroidea, la obesidad, el alcoholismo o la diabetes.

Cada sabor tiene un mecanismo de codificación específico, que es mediado por proteínas receptoras especializadas. Estudios realizados sobre las diversas vías de transducción de los estímulos indican que los estímulos de los sabores ácido y salado interactúan directamente con los canales de iones y canales de sodio mientras que los estímulos del sabor dulce, umami y amargo activan los receptores acoplados a proteínas G, interactúan con las familias T1R y T2R.

Aunque el sabor amargo es importante para la salud humana, se conoce poco sobre los factores que determinan la especificidad de los ligandos. Los receptores TAS2R, como el TAS2R16, ayudan a definir la percepción gustativa. Cada receptor puede acomodar una amplia diversidad de estructuras químicas, y a la vez lograr una alta especificidad. Sin embargo, el conocimiento sobre cómo estos receptores acoplados a proteínas G logran este balance es muy pobre.

El objetivo de este proyecto es contribuir a entender mejor las bases moleculares de la percepción de gusto amargo. Para ello, se ha analizado estructuralmente la localización de residuos funcionalmente relevantes identificados en un estudio reciente (Thomas, y otros, 2017) utilizando un modelo molecular actualizado de TAS2R16. Además, se ha modelado la unión de TAS2R16 con compuestos representativos relacionados con el sabor amargo mediante simulaciones computacionales de *docking* para posteriormente estudiar el impacto de dichas mutaciones en la unión a los diferentes compuestos en base a los modelos obtenidos.

Los resultados obtenidos proporcionan una explicación racional a los resultados experimentales reportados en el estudio citado anteriormente, por lo que podemos considerar que el modelo y el método utilizados son coherentes. El protocolo desarrollado en este trabajo podrá utilizarse en el futuro para el estudio de otros receptores de la familia TAS2R16, y así profundizar en la caracterización de las especificidades de cada receptor por los diferentes compuestos amargos.

ABSTRACT

Food preferences have a great relevance not only in socio-economic sectors such as the food and wine industry, but also in human health, and they depend on cultural, sociological, nutritional and genetic factors. The latter are directly related to the degree of taste perception influencing the nutrition and predisposition of individuals to certain diseases. Some foods have toxic substances that generate a bitter taste, and individuals who are not able to perceive such taste have more tendency to eat foods that contain these compounds and to accumulate toxins in the body, making them more likely to acquire diseases related to thyroid dysfunction, obesity, alcoholism or diabetes.

Each flavor has a specific coding mechanism, which is mediated by specialized receptor proteins. Studies on the various pathways of stimuli transduction indicate that the stimuli of the acidic and salty flavours interact directly with the ion channels and sodium channels, while the stimuli of the sweet taste, umami and bitter activate G-protein coupled receptors, interact with the families T1R and T2R.

Although bitter taste is important for human health, little is known about the factors that determine ligand specificity. TAS2R receptors, such as TAS2R16, help to define taste perception. Each receptor can accommodate a broad diversity of chemical structures, while achieving a high specificity. However, knowledge about how these G-protein-coupled receptors achieve this balance is very limited.

The aim of this project is to contribute to a better understanding of the molecular basis of the perception of bitter taste. To this end, the location of functionally relevant residues identified in a recent study (Thomas, et al., 2017) has been structurally analysed using an updated molecular model of TAS2R16. In addition, the binding of TAS2R16 to representative compounds related to the bitter taste has been modeled through computational docking simulations, and these models have been used to further study the impact of such mutations on the interactions with the different compounds.

The results obtained provide a rational explanation to the experimental results reported in the above mentioned study, so we can consider that both the model and the proposed protocol are consistent. The protocol developed in this work could be used in the future for the study of other receptors of the TAS2R16 family, in order to further advance in the characterization of the specificities of each receptor for the different bitter compounds.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas y siglas.....	6
Lista de Figuras.....	6
Lista de tablas.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
EL SABOR AMARGO EN LA PERCEPCIÓN SENSORIAL DEL VINO.....	10
GENÉTICA DEL SABOR AMARGO Y SALUD.....	10
FISIOLOGÍA DEL GUSTO.....	12
VIA GUSTATIVA.....	12
EL SISTEMA GUSTATIVO A NIVEL CELULAR.....	13
LAS PROTEINAS Y SU ESTRUCTURA.....	14
RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs).....	16
LOS RECEPTORES DEL GUSTO.....	18
LOS RECEPTORES TAS2R.....	19
RECEPTOR TAS2R16.....	21
OBJETIVOS.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
MÉTODOS.....	25
LINUX.....	25
BASES DE DATOS.....	25
ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y VISUALIZACIÓN DE MUTACIONES.....	26
CÁLCULOS DE DOCKING ENTRE PROTEÍNA Y LIGANDO.....	26
AGRUPACIÓN DE RESULTADOS (<i>CLUSTERING</i>).....	27
RESULTADOS.....	28
ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS MUTACIONES QUE AFECTAN A LA FUNCIÓN.....	28
MODELADO ESTRUCTURAL DE LA UNIÓN DEL RECEPTOR A LIGANDOS.....	30
IMPACTO ESTRUCTURAL DE MUTACIONES DE TAS2R16 EN LA UNIÓN A LIGANDO.....	34

APLICACIÓN A UN CASO DE INTERÉS EN LA QUÍMICA DEL VINO: UNIÓN DE TAS2R16 A LA MALVIDINA-3-O-MONOGLUCÓSIDO.....	36
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
ANEXO	I

Lista de abreviaturas y siglas

ATP: adenosín trifosfato	ICVV: Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino
CaM: calmodulina	IP ₃ : inositol trifosfato
cAMP: adenosín monofosfato cíclico	PBS: solución salina tamponada con fosfato
ECL: bucles extracelulares	PDB: base de datos de proteínas
GDP: guanosín difosfato	RMSD: distancia media cuadrática mínima
GPCR: receptores acoplados a proteínas G	SO: sistema operativo
GTP: guanosín trifosfato	SST3: receptor sensorial
GUI: interfaz gráfica de usuario	T(Nº)R: receptor (o gen) del gusto tipo (Nº)
HTFC: citometría de flujo de alto rendimiento	T(Nº1)R(Nº2): receptor (o gen) del gusto tipo (Nº1), miembro (Nº2)
ICM: ICM-browser (ver Métodos)	(Nº)TM: dominio transmembrana (Nº)

Lista de Figuras

<i>Figura 1: Sistema gustativo. Papilas. (Aragón, s.f.)</i>	13
<i>Figura 2 Estructura de un aminoácido</i>	14
<i>Figura 3 Reacción de deshidratación para la formación de un enlace peptídico</i>	15
<i>Figura 4: Mecanismo de transducción para el gusto: la molécula de sabor (S) se une al receptor de gusto (SR) y activa la proteína G gustducina (Ggust). La subunidad de Ggust activa la adenilil ciclasa (AC) de la membrana apical aumentando la concentración de cAMP. La PKA, activada por cAMP fosforila un canal de K⁺ en la membrana basolateral, haciendo que se cierre. El flujo reducido de ion potasio fuera de la célula la despolariza. (Nelson, Cuchillo Foix, Lehninger, & Cox, 2005)</i>	18
<i>Figura 5: Estructura primaria del receptor del sabor amargo TAS2R16. Modelo del 03/09/2019 (GPCRdb)</i>	21
<i>Figura 6: Se representan los Cα de los residuos mutados que han producido una modificación en la señal en un estudio previo (cpk en rojo). En gris se representa la estructura del receptor TAS2R16</i>	28
<i>Figura 7: Residuos funcionalmente relevantes (en rojo) representados en el receptor TAS2R16 (en gris) con una perspectiva del interior del canal.</i>	29
<i>Figura 8: Representación de la superficie del receptor TAS2R16 (en gris) con los residuos cuya mutación produce una modificación de la señal (en rojo).</i>	29
<i>Figura 9: Visualización de las mutaciones en la estructura primaria del modelo del receptor TAS2R16 previamente utilizado para el estudio mutacional (Thomas, y otros, 2017).</i>	30

Figura 10: Representación del centro de masas (en verde) de las mutaciones de TAS2R16 que se ha determinado que afectan a la especificidad del ligando (en lila) 31

Figura 11: Representación de los 100 resultados de la Salicina (en ocre y rojo) con mejor resultado en el receptor TAS2R16 (en gris) para la caja de 39 y 15 Å..... 32

Figura 12: Análisis comparativo de los modelos de docking entre salicina y TAS2R16 con complejos homólogos de estructura disponible. Se representan las 10 mejores modelos de docking de acuerdo con la energía de Glide (con átomos de carbono en amarillo) y TAS2R16 (en gris), y el receptor de la angiotensina (homólogo estructural de TAS2R16) unido a dos compuestos de bajo peso molecular, con PDB 4YAY (en verde) y 4ZUD (en ocre). Los receptores TAS2R16 y el receptor de la angiotensina se han superpuesto estructuralmente. Se muestra la caja interior usada en el docking (en magenta), y el punto (en azul) utilizado para calcular el centro de la caja. En el panel de la derecha se muestra una ampliación de la vista del centro activo para un mayor detalle. 33

Figura 13: Representación de los 10 resultados de la salicina (en ocre y rojo) con mejor resultado clusterizado en el receptor TAS2R16 (en gris). 34

Figura 14: Estructura química de la malvidina-3-O-monoglucósido. (PubChem, 2020)..... 37

Figura 15: Representación de los 10 resultados con mejor puntuación de las poses clusterizadas de la malvidina-3-O-monoglucósido (en ocre y rojo) en el receptor TAS2R16 (en gris). 37

Figura 16: Representación de los 100 resultados de la Salicina (en ocre y rojo) con mejor puntuación en el receptor TAS2R16 (en gris) para las cajas de caja interior 1: A) caja de 39 Å; B) la caja de 44 Å; C) la caja de 49 Å; D) la caja de 54 Å; E) la caja de 59 Å; F) la caja de 64 Å; G) la caja de 69 Å; H) la caja de 74 Å..... II

Figura 17: Representación de los 100 resultados de la Salicina (en ocre y rojo) con mejor puntuación en el receptor TAS2R16 (en gris) para las cajas de caja interior 2: A) la caja de 44 Å; B) la caja de 49 Å; C) la caja de 54 Å; D) la caja de 59 Å; E) la caja de 64 Å; F) la caja de 69 Å; G) la caja de 74 Å III

Figura 18: Representación de los 100 resultados con mejor puntuación de los ligandos (A, B y C, en ocre y rojo) en el receptor TAS2R16 para la caja de 39 Å de caja interior 2: A) β-glucosaminida; B) 4-NP-β-manósido; C) hexil-β-glucósido..... IV

Figura 19: Representación de los 100 resultados con mejor puntuación de los ligandos (A, B y C, en ocre y rojo) en el receptor TAS2R16 para la caja de 74 Å de caja interior 2: A) β-glucosaminida; B) 4-NP-β-manósido; C) hexil-β-glucósido..... IV

Figura 20: Representación de los 10 resultados con mejor puntuación en el receptor TAS2R16 (en gris) para la caja de 39 Å de caja interior 2 de: A) todos los ligandos B) salicina (en ocre y rojo); C) β-glucosaminida (en ocre y rojo); D) 4-NP-β-manósido (en ocre y rojo); E) hexil-β-glucósido (en ocre y rojo). V

Figura 21: Representación de los 10 resultados con mejor puntuación en el receptor TAS2R16 (en gris) para la caja de 74 Å de caja interior 2 de: A) todos los ligandos B) salicina (en ocre y rojo); C) β-glucosaminida (en ocre y rojo); D) 4-NP-β-manósido (en ocre y rojo); E) hexil-β-glucósido (en ocre y rojo). VI

Figura 22: Representación de los 10 resultados de los ligandos (A, B, C y D en ocre y rojo) con mejor resultado clusterizado en el receptor TAS2R16 (en gris): A) salicina; B) β -glucosaminida; C) 4-NP- β -manósido; D) hexil- β -glucósidoVII

Lista de tablas

<i>Tabla 1: Dimensiones de las cajas generadas</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 2: Impacto estructural de las mutaciones funcionalmente relevantes en las posiciones de docking representativas para cada ligando (considerando 6 Å de distancia entre residuos y ligandos).....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 3: Impacto estructural de las mutaciones funcionalmente relevantes en las posiciones de docking representativas para cada ligando (considerando 10 Å de distancia entre residuos y ligandos).....</i>	<i>VIII</i>

INTRODUCCIÓN

Definimos gusto como las sensaciones que surgen en la cavidad oral, y que biológicamente tienen su origen en un sistema gustativo quimiosensorial altamente especializado anatómicamente y fisiológicamente. Además del sabor, la comida normalmente evoca otras sensaciones como olor, textura, temperatura... Aunque no siempre es fácil separar las sensaciones, los componentes no gustativos son percibidos por sistemas diferentes.

La supervivencia de los animales depende del consumo de nutrientes. Sin embargo, las fuentes de nutrientes a veces contienen sustancias tóxicas. El gusto ayuda a los animales a decidir si un alimento puede ser consumido o si es peligroso y tiene que rechazarlo. Probablemente el gusto ha evolucionado para asegurar que los animales eligen los alimentos apropiados para satisfacer las necesidades de su cuerpo (Bachmanov & Beauchamp, 2007).

Hay evidencias que apoyan la idea de que la percepción del sabor juega un papel clave en las preferencias de alimentos, los hábitos dietéticos y otras cuestiones de salud. Los humanos distinguen 5 sabores: salado, dulce, ácido, amargo y umami que son comúnmente conocidos como los sabores básicos. Sin embargo, este aparentemente limitado repertorio parece suficiente para dar cabida a la demanda evolutiva de reconocimiento de los elementos dietéticos esenciales, evitando al mismo tiempo posibles amenazas alimentarias con efectos negativos en el estado nutricional y fisiológico (Chandrashekar, Hoon, Ryba, & Zuker, 2006).

Los sabores dulce, amargo y umami son considerados los más importantes para la aceptación de alimentos. Dependen de la activación de diferentes receptores de las familias de genes TAS1R y TAS2R que se expresan en subpoblaciones distintas de células gustativas del sistema gustativo humano, y que estructuralmente pertenecen a la familia de proteínas de los receptores siete-transmembrana (7TM), o proteínas acopladas a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés).

Se ha descrito que los sabores dulce y umami son percibidos únicamente por los receptores TAS1R, una pequeña familia de proteínas GPCR que en humanos incluyen 3 miembros: TAS1R1, TAS1R2 y TAS1R3. Estas proteínas sólo actúan como heterodímeros y, mientras que el dímero TAS1R1+TAS1R3 sólo actúa como principal receptor de umami, TAS1R2+TAS1R3 responde a una amplia variedad de ligandos dulces naturales y artificiales. Por otro lado, el sabor amargo se encuentra asociado principalmente a receptores de la familia TAS2R, de la que hay 25 miembros en humanos, todos ellos activos como receptores monoméricos (Valente, y otros, 2018). El sabor amargo es de gran importancia en la industria alimentaria, y en el sector vitivinícola en particular, y tiene importantes repercusiones en la salud humana.

EL SABOR AMARGO EN LA PERCEPCIÓN SENSORIAL DEL VINO

Normalmente el amargor es un sabor desagradable, pero en el caso de bebidas como el vino o la cerveza, es un atributo necesario cuando se presenta con una intensidad moderada. Los atributos del vino se suelen evaluar mediante análisis sensoriales. Sin embargo, cuando se trata de la evaluación del sabor amargo aparecen dificultades porque hay discrepancias entre los panelistas debido, entre otras razones, a la diferente percepción de este sabor que manifiestan los seres humanos. Esto dificulta la identificación de algunos de los compuestos amargos presentes en el vino.

En el caso del vino tinto se considera que el sabor amargo está principalmente inducido por compuestos polifenólicos, como los flavonoles, ácidos hidroxicinámicos o proantocianidinas dímeras. Sin embargo, los datos disponibles respecto a la relación entre estructura y amargor de estos compuestos polifenólicos son limitados e inconsistentes. Recientemente, se ha apuntado a que el sabor amargo puede ser inducido por otros compuestos polifenólicos como son los antocianos y que están ampliamente presentes en los vinos tintos (Soares, y otros, 2013; Soares, Brandao, Mateus, & de Freitas, 2017). Hasta estos trabajos, a estos compuestos solamente se les consideraba responsables del color de los vinos.

En un intento de entender mejor la relación estructura/amargor y superar la inconsistencia de los paneles sensoriales, se han identificado los receptores TAS2R activados por varios compuestos polifenólicos (Soares, y otros, 2013), demostrando la relación de una serie de compuestos presentes en alimentos con distintos receptores del amargor TAS2R.

GENÉTICA DEL SABOR AMARGO Y SALUD

Las investigaciones genéticas orientadas en la percepción del sabor amargo comenzaron en 1931 cuando Arthur L. Fox y su colaborador el doctor C. R. Noller tuvieron percepciones distintas sobre el sabor amargo tras sufrir un accidente en el laboratorio con feniltiocarbamida (PTC). Noller percibió un sabor amargo intenso en el ambiente mientras que Fox no lo advirtió, lo que llamó su atención e hizo que dirigiera su investigación en las distintas maneras de percibir el sabor amargo en los humanos. (Fox, 1932).

Aunque el sabor amargo es importante para la salud humana, se conoce poco sobre los factores que determinan la especificidad de los ligandos. Los receptores TAS2R, como el TAS2R16, ayudan a definir la percepción gustativa y las preferencias en la dieta que, en última instancia, influirán en la salud y enfermedades humanas. Cada receptor puede acomodar una amplia diversidad de estructuras químicas, y a la vez lograr una alta especificidad, de forma que la

diversidad de toxinas amargas existentes puede ser detectada sin probar todos los alimentos amargos. Sin embargo, el conocimiento sobre cómo estos receptores acoplados a proteínas G logran este balance es muy pobre.

Como se ha mencionado, la percepción del sabor amargo en humanos está mediada por 25 miembros muy divergentes de la familia de receptores TAS2R. Los receptores TAS2R son expresados tanto en células del gusto, como en células respiratorias y del tracto gastrointestinal (Thomas, y otros, 2017). Estos receptores han evolucionado para detectar la extraordinaria diversidad de compuestos amargos que se encuentran naturalmente en alimentos y toxinas, traduciendo esta detección en la percepción gustativa por la señal que producen los receptores acoplados a proteínas G. El prototípico receptor del gusto amargo TAS2R16 es conocido por responder aproximadamente a 30 compuestos beta-glucósidos diferentes, cuya estructura molecular consiste en un monosacárido de D-glucosa unido a un átomo de oxígeno en un grupo fenilo. Muchas plantas, incluidos los vegetales crucíferos como el brócoli o las coles de Bruselas, contienen β -glucósidos amargos como salicina, sinigrina, arbutina y amigdalinas. Así, el receptor juega un papel central en la determinación de las preferencias en la dieta humana o en evitar algunos vegetales, elecciones importantes en la dieta que por último influyen en la salud humana.

La habilidad de percibir el sabor amargo a través de la activación de los receptores TAS2R permite la selección de alimentos beneficiosos y seguros para la ingesta, y el rechazo de las toxinas potenciales. Sin embargo, la detección del sabor amargo debe adaptarse a una amplia diversidad de estructuras químicas encontradas en la naturaleza. Debido a estos requisitos los receptores TAS2R han sido objeto de grandes presiones evolutivas, resultando en un número sustancial de polimorfismos que pueden modular las decisiones diarias que tienen impacto sobre la salud, las enfermedades y la longevidad. Por ejemplo, la aparición de polimorfismos individuales en los receptores TAS2R influyen en el índice de masa corporal, el alcoholismo, la adicción al tabaco, la adicción a medicamentos y en la esperanza de vida humana. Solo el receptor humano TAS2R16 tiene por lo menos 17 polimorfismos naturales, incluyendo una variante alélica en el aminoácido 172 que es asociada con la disminución de la sensibilidad a los β -glucósidos y se relaciona con la dependencia al alcohol. Comprender como estos polimorfismos influyen en la estructura y función de los receptores TAS2R podría proporcionar una explicación mecánica de cómo los genotipos TAS2R se traducen en fenotipos y comportamientos humanos. (Thomas, y otros, 2017).

FISIOLOGÍA DEL GUSTO

Las investigaciones genéticas enfocadas a la percepción del sabor han permitido entender y caracterizar 5 sabores principales: dulce, salado, amargo, ácido y umami (Matsunami, Montmayeur, & Buck, 2000). La presencia de distintas propiedades gustativas implica diferentes tipos mecanismos de codificación. La respuesta a los sabores se clasifica según el tipo de receptor:

- **Receptores iónicos:** sabores ácido y salado.
- **Receptores metabotrópicos:** sabores dulce, amargo y umami (acoplados a proteínas G). Esta proteína G activa la vía de la fosfolipasa C, produce IP₃ y provoca la liberación de Ca²⁺ intracelular pudiendo transmitirse la señal.

Los distintos mecanismos para cada sabor se describen a continuación:

- **Ácido:** los ácidos se desprotonan en solución. Estos protones (H⁺) entran por canales de protones y despolarizan la membrana.
- **Salado:** la sal, concretamente el catión sodio (Na⁺), entra por canales y también despolariza la membrana.
- **Dulce:** se unen monosacáridos, algún disacárido, alcoholes, cetonas, aldehídos, algún aminoácido... y desencadenan una actividad asociada a proteína G.
- **Amargo:** se unen a quinina, cafeína, nicotina, salicina...
- **Umami:** unen glutamato principalmente.

VIA GUSTATIVA

La lengua es considerada el principal órgano gustativo. En la superficie están distribuidas las papilas, que contienen en su interior los botones gustativos. Dentro de estas estructuras están organizadas las células receptoras del gusto donde se hallan las proteínas receptoras del sabor que serán las que interactúen con el estímulo gustativo y transmitirán, mediante los nervios aferentes, una señal que llegará hasta las neuronas.

Los diferentes sabores pueden modificar el potencial de membrana de las neuronas. Si el estímulo es fuerte, se llegará a un umbral y se disparará el potencial de acción. Este potencial de acción va hacia el bulbo raquídeo (donde se da la primera sinapsis) en el "núcleo del tracto solitario".

Las diferentes zonas de la lengua van por los nervios craneales:

- Parte más externa por el nervio facial.
- Parte media por el nervio glossofaríngeo.
- Parte más interna por el nervio vago.

La segunda sinapsis se da en el tálamo. De ahí va al área gustativa primaria, en el lóbulo parietal/frontal e ínsula. Toda esta información sensorial va al área gustativa secundaria, corteza

orbitofrontal, que recibe distintas informaciones sensoriales y es la que al final produce la sensación de los diferentes sabores (Voet, Voet, & Pratt, 2016).

EL SISTEMA GUSTATIVO A NIVEL CELULAR

El sentido del gusto en vertebrados refleja la actividad de las neuronas gustativas agrupadas en las papilas gustativas de la lengua. El sistema gustativo en mamíferos lo forman las papilas y los botones gustativos, las células gustativas y las familias de proteínas receptoras. Los receptores del sentido del gusto se encuentran en los botones gustativos. Éstos se sitúan principalmente en la superficie de la lengua, aunque también hay algunos en la epiglotis. Se pueden agrupar en las papilas gustativas de diferente forma donde cada papila puede contener de 3 a 300 botones gustativos.

Existen los siguientes tipos de papilas gustativas (Figura 1):

- Caliciformes: tienen entre 100-300 botones gustativos. Situadas en la parte interna lengua.
- Fungiformes: presentan unos 5 botones gustativos. Se sitúan por toda la lengua.
- Foliados: poseen un número intermedio. Situadas en los laterales.

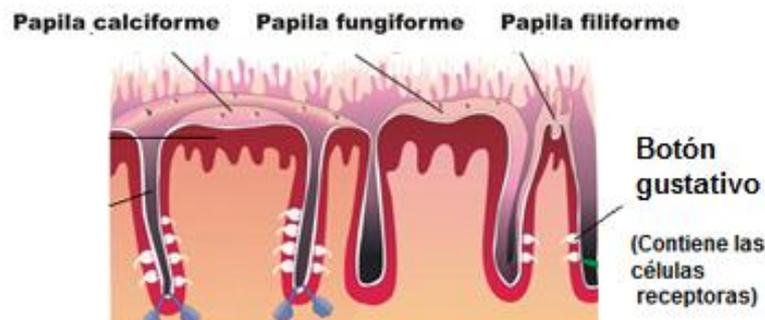


Figura 1: Sistema gustativo. Papilas. (Aragón, s.f.)

Los botones se sitúan en estas papilas, concretamente en las microvellosidades que presentan para aumentar la superficie de recepción.

Además de las células gustativas, en los botones también hay células de soporte y células basales. Las células basales son células madre que permiten la renovación celular. Las papilas gustativas se pierden mucho más rápido y las células basales las renuevan cada 15 días aproximadamente (Voet, Voet, & Pratt, 2016).

El inicio de la percepción del sabor se da en las papilas gustativas cuando un estímulo interacciona con las células receptoras del gusto a través de las proteínas receptoras. La interacción producirá una señal que se transmite al cerebro, a través de los nervios para evocar la percepción del sabor (Bachmanov, y otros, 2014). Para entender los mecanismos de la

percepción del sabor a nivel molecular, y estimar el impacto de mutaciones en dicha percepción, es fundamental conocer en detalle la estructura molecular de las proteínas receptoras.

LAS PROTEINAS Y SU ESTRUCTURA

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes, presentes en todas las células en una gran variedad de tamaños, desde péptidos pequeños hasta grandes polímeros. Presentan gran diversidad en cuanto a su función biológica. Son los instrumentos moleculares mediante los que se expresa la información genética.

Todas las proteínas están constituidas a partir del mismo conjunto de 20 aminoácidos que se unen de forma covalente en secuencias características. Los aminoácidos están formados por un grupo carboxilo y un grupo amino que se unen al mismo átomo de carbono (C_{α}). Se diferencian unos de otros en las cadenas laterales (grupos R) que varían en estructura, tamaño y carga. Son α -aminoácidos. (Figura 2).

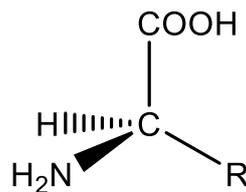


Figura 2 Estructura de un aminoácido

En todos los aminoácidos, excepto en la glicina, el carbono α está unido a 4 grupos distintos, por tanto, es un centro quiral. Los grupos pueden ocupar dos ordenamientos distintos que dan lugar a dos formas enantioméricas. Para especificar la configuración absoluta de los sustituyentes del C_{α} se ha desarrollado el sistema D, L.

Se observa que casi todos los compuestos biológicos con centro quiral se presentan en la naturaleza en una sola de sus formas isómeras. Los residuos aminoácidos de las proteínas son exclusivamente L-estereoisómeros. La formación de estructuras estables y repetidas en proteínas requiere que sus aminoácidos sean de la misma serie estereoquímica. Por tanto, implica que en las células se den reacciones estereoespecíficas que sinteticen los isómeros L de los aminoácidos.

Los aminoácidos se clasifican en 5 tipos en función de su polaridad y la carga de sus grupos.

Dos aminoácidos se unen de forma covalente a través de un enlace amida sustituido conocido como enlace peptídico. Este enlace se forma por deshidratación y sucesivos enlaces dan lugar a la formación de péptidos y proteínas (Figura 3).

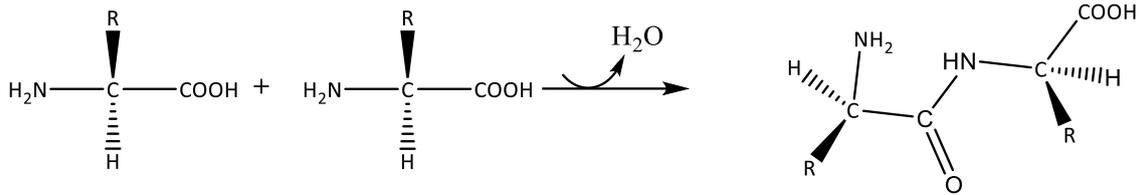


Figura 3 Reacción de deshidratación para la formación de un enlace peptídico

Las proteínas pueden ser cadenas de 100 a varios miles de residuos o estar compuestas de varias cadenas polipeptídicas asociadas de forma covalente denominadas subunidades. Sin embargo, algunos péptidos naturales sólo tienen unos pocos aminoácidos.

Las proteínas presentan cuatro niveles de estructura. Se denomina estructura primaria a la secuencia de aminoácidos de una proteína. Ésta no está fijada, se puede dar cierta flexibilidad en las variaciones secuenciales que, en principio, no tienen ningún efecto o muy poco sobre la función de la proteína, se conocen como polimorfismos proteicos.

A pesar de los polimorfismos, la mayoría de las proteínas contienen regiones cruciales que son esenciales para su función y cuya secuencia se encuentra, por tanto, conservada. La presencia de polimorfismos en esta parte de la secuencia esencial para la función, sí que presentaría efecto sobre la función de la proteína y se podrían considerar mutaciones.

El esqueleto de una proteína típica está compuesto por centenares de enlaces individuales que permiten una rotación libre alrededor de muchos de éstos, por lo que las proteínas podrían adoptar ilimitadas conformaciones. En cambio, cada proteína tiene una función específica que sugiere que adopta una estructura tridimensional única.

La estructura tridimensional de una proteína viene determinada por su secuencia de aminoácidos (estructura primaria) y ésta es determinante para la función. Las fuerzas que estabilizan la estructura específica de una proteína son interacciones no covalentes. Estas interacciones no covalentes son interacciones débiles entre las que destacan las hidrofóbicas por su mayor contribución a la estabilidad. Los enlaces de hidrógeno y las interacciones iónicas estarán optimizados para las estructuras termodinámicamente estables.

La naturaleza de los enlaces covalentes en el esqueleto polipeptídico impone limitaciones estructurales. El enlace peptídico tiene un carácter de doble enlace que mantiene a los seis átomos del grupo peptídico en una configuración plana rígida. Los enlaces N-C_α y C_α-C pueden girar adoptando distintos valores de los ángulos psi y phi. Conociendo el valor de estos ángulos para todos los aminoácidos se podría definir la estructura secundaria de un segmento.

La estructura secundaria es una disposición regular de una secuencia de aminoácidos de la cadena en la que cada residuo se relaciona espacialmente con sus vecinos de la misma forma. Las estructuras secundarias más comunes son la α -hélice, la conformación β y los β -giros.

Cuando se habla de la estructura tridimensional completa de una cadena, normalmente se hace referencia a la estructura terciaria. Esta estructura nos ayuda a definir dos clases generales de proteínas: fibrosas y globulares.

Las proteínas fibrosas desempeñarán papeles estructurales. Las forman elementos repetitivos simples de estructura secundaria. Sin embargo, las proteínas globulares tienen estructuras terciarias más complicadas con varios tipos de estructura secundaria en la misma cadena.

La estructura cuaternaria aparece debido a interacciones entre subunidades de proteínas.

La estructura tridimensional y la función de las proteínas se puede destruir por desnaturalización lo que demuestra la relación entre estructura y función. Algunas proteínas pueden renaturalizarse espontáneamente para formar proteínas biológicamente activas, lo que corrobora que la estructura terciaria está determinada en la secuencia de aminoácidos.

La adquisición de estructura terciaria a partir de la cadena polipeptídica se conoce como plegamiento de proteínas, que es un proceso reversible y que puede implicar la existencia de varios caminos, por ejemplo, formándose primero los elementos de estructura secundaria, seguidos por la formación de estructuras supersecundarias. En muchas proteínas, se han identificado intermediarios de plegamiento que evolucionan hacia una única conformación nativa. (Nelson, Cuchillo Foix, Lehninger, & Cox, 2005)

RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs)

Los GPCR forman una de las familias de proteínas más grandes que se conocen. Esta familia incluye receptores para nucleótidos, Ca^{2+} , aminas biógenas, catecolaminas...

Estos receptores son proteínas integrales de membrana con siete hélices α transmembrana de tamaño generalmente uniforme (20-27residuos), que son suficientes para atravesar la bicapa lipídica. Sin embargo, sus segmentos N y C terminales y los bucles que conectan las hélices pueden variar en longitud. Estas son las porciones de la proteína que participan en la unión de los ligandos (cara extracelular) y de las proteínas G heterotriméricas (cara citoplasmática). (Voet, Voet, & Pratt, 2016)

Los receptores acoplados a proteínas G son componentes esenciales de un mecanismo importante de transducción de señal en la célula. Dicho mecanismo consta de 3 componentes

principales: el receptor de membrana plasmática, un enzima de la membrana plasmática que genera un segundo mensajero intracelular y una proteína que une un nucleótido de guanosina (proteína G).

El funcionamiento es el siguiente: la proteína G estimulada por el receptor activado intercambiará el GDP unido, por GTP, formando así el complejo GTP-proteína que se disociará del receptor ocupado y se unirá a un enzima próximo alterando su actividad.

El calcio es uno de los segundos mensajeros en muchas transducciones de señal, desencadena respuestas intracelulares. Normalmente la concentración de calcio ($[Ca^{2+}]$) citosólica se mantiene muy baja, por debajo de $10^{-7}M$, por acción de las bombas de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático, la mitocondria y la membrana plasmática. Los estímulos provocan una entrada de Ca^{2+} al interior de la célula a través de los canales específicos de Ca^{2+} de la membrana plasmática o liberan el Ca^{2+} retenido por el retículo endoplasmático o la mitocondria, en ambos casos aumenta la $[Ca^{2+}]$ citosólica y desencadena la respuesta celular.

Es frecuente que la concentración de Ca^{2+} no sólo aumente y a continuación decaiga, sino que oscile en periodos de varios segundos, incluso cuando la concentración extracelular de estímulo permanece constante. En el mecanismo según el cual se producen las oscilaciones de la concentración de ion calcio interviene, probablemente, una regulación por retroalimentación de Ca^{2+} sobre la fosfolipasa que produce IP_3 o sobre el canal iónico que regula la liberación de calcio del retículo endoplasmático, o ambos. Independientemente del mecanismo, el efecto es que una clase de señal se convierte en otra.

Los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular son detectados por proteínas de unión de ion calcio que regulan un conjunto de enzimas dependientes de Ca^{2+} . La calmodulina (CaM) es una proteína ácida con cuatro sitios de unión de Ca^{2+} de alta afinidad, por ejemplo, que puede regular la actividad proteica.

El genoma humano codifica más de 1000 miembros de esta familia de receptores GPCRs que cumplen funciones muy específicas y variadas. Por ejemplo, la transducción sensorial en la vista, el olfato y el gusto. En la Figura 4 se muestra el mecanismo de transducción para el gusto.

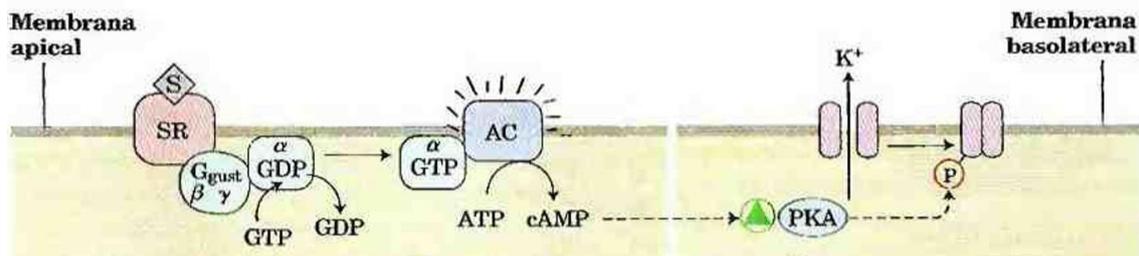


Figura 4: Mecanismo de transducción para el gusto: la molécula de sabor (S) se une al receptor de gusto (SR) y activa la proteína G gustducina (Ggust). La subunidad de Ggust activa la adenilil ciclasa (AC) de la membrana apical aumentando la concentración de cAMP. La PKA, activada por cAMP fosforila un canal de K⁺ en la membrana basolateral, haciendo que se cierre. El flujo reducido de ion potasio fuera de la célula la despolariza. (Nelson, Cuchillo Foix, Lehninger, & Cox, 2005)

Todos los sistemas de transducción de señal bien estudiados que actúan a través de proteínas G heterotriméricas comparten características estructurales comunes. Los receptores tienen siete segmentos transmembrana, un dominio (generalmente el bucle entre las hélices 6 y 7) que interactúa con una proteína G y un dominio citoplasmático en el extremo carboxilo-terminal que experimenta la fosforilación reversible de varios residuos de serina y trionina. El sitio de unión del ligando (*binding-pocket*) está situado en lo profundo de la membrana y contiene residuos de varios segmentos transmembrana. La unión del ligando induce un cambio de conformación en el receptor, exponiendo un dominio que puede interactuar con una proteína G. Las proteínas G heterotriméricas activan o inhiben los enzimas efectores, que modifican la concentración de un segundo mensajero. En las neuronas sensoriales el resultado es un cambio en el potencial de membrana y la consiguiente señal eléctrica que pasa de una neurona a otra en la ruta que conecta las células sensoriales con el cerebro. Todos estos sistemas se autoinactivan por la acción de la GTPasa intrínseca de las proteínas G, que convierte al GTP en GDP. (Nelson, Cuchillo Foix, Lehninger, & Cox, 2005)

LOS RECEPTORES DEL GUSTO

Los receptores del gusto funcionan como quimiorreceptores que interactúan con estímulos o ligandos, para iniciar una señal aferente que se transmite al cerebro y resultará en la percepción del sabor. Muchos de los ligandos no pueden traspasar fácilmente la membrana celular, por eso se cree que los receptores del gusto son una parte de las membranas de las células receptoras del gusto. Consistente con esta creencia, los receptores T1R y T2R pertenecen a una superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) con los 7 dominios transmembrana característicos. Sin embargo, otros estímulos del gusto sí que pueden penetrar la membrana celular, como el sodio, los protones y algunos compuestos amargos y dulces. Estos compuestos pueden interactuar con objetivos intracelulares para activar las células receptoras del gusto, y por lo tanto la definición de lo que sería un receptor del gusto para tales ligandos es menos clara.

Aunque se han sugerido un gran número de proteínas como receptores gustativos, no todas ellas han sido aceptadas como tal. En un estudio (Bachmanov & Beauchamp, 2007) proponen los siguientes criterios para considerar que una molécula funciona como receptor del gusto:

- La identidad molecular de los receptores candidatos tiene que estar establecida
- Su expresión en las células receptoras del gusto debe ser confirmada
- Los ligandos apropiados deben ser identificados
- Debe demostrarse que los cambios en la función del gusto resultan de los cambios en el receptor

Las publicaciones sobre receptores del gusto tenían muchas discrepancias en el nombre de los genes y las proteínas y esto generaba confusión y dificultades a la hora de comparar descripciones del mismo gen. La confusión con la identificación de los genes de los receptores del gusto y las proteínas subraya la importancia de seguir las reglas de nomenclatura. Las pautas estándar para nombrar los genes para las dos familias mejor caracterizadas de genes humanos, de ratones y de ratas de los receptores del sabor, T1R y T2R, siguen la siguiente descripción: "Receptor del gusto, tipo 1, miembro 1". Su correspondiente abreviatura será Tas1r1, para ratones, o TAS1R1, para humanos; el símbolo correspondiente a la proteína es T1R1. Para hacerlo más breve y, sobre todo, cuando nos referimos a genes tanto humanos como de roedores, lo describimos como T...R. Además de por las letras (mayúsculas o minúsculas) los genes se pueden distinguir también por los números de miembro. Los genes humanos tienen números inferiores a 100 y los roedores superiores. Para otras especies, se añade la primera letra del nombre de la especie en minúscula delante del código.

Se han propuesto varios sistemas de clasificación para esta familia de GPCRs. Uno de los que se usan con más frecuencia clasifica las GPCRs de los vertebrados e invertebrados en 6 clases: A, B, C, D, E y F. De acuerdo con esta clasificación las T1Rs pertenecen a la clase C (glutamato metabotrópico) y los T2Rs son descritos como clase A (similares a la rodopsina). Recientemente, el sistema de clasificación GRAFTS ("glutamaterhodopsin-adhesion-frizzled/taste2-secretin") ha sido desarrollado basándolo en el análisis filogenético de las partes transmembrana. Atendiendo a esta clasificación, los T1Rs pertenecen a la familia del glutamato y los T2Rs forman un clúster distinto dentro de la familia "frizzled/taste2". (Bachmanov & Beauchamp, 2007)

LOS RECEPTORES TAS2R

La existencia de una familia de receptores de gusto amargo se predijo hace aproximadamente 20 años por I. Lush, un genetista que estudiaba las diferentes cepas de ratón en el rechazo a los alimentos con sabor amargo. Los genes T2R fueron descubiertos en el año 2000 por Chandrashekar y otros (Chandrashekar, y otros, 2000) y se caracterizan por no poseer intrones

y ser los responsables de codificar los receptores T2R. Basaron este descubrimiento en análisis del reciente lanzamiento de las secuencias del genoma humano en las regiones del genoma relacionadas con la sensibilidad al gusto amargo en humanos y ratones.

Los TAS2Rs son proteínas con 290-330 residuos que presentan gran similitud en su estructura primaria y que pueden reconocer compuestos de una amplia variedad estructural.

Los principales sitios de expresión de los genes T2R en mamíferos son las células receptoras del sabor de las papilas gustativas circunvaladas, foliadas, de la epiglotis y, en menor grado, en las papilas fungiformes (Bachmanov & Beauchamp, 2007). Además, otra característica interesante de estos receptores, que se ha considerado en informes recientes, sobre la expresión de éstos en tejidos no gustativos sugiere que estas proteínas tienen funciones adicionales a la detección del sabor (Beherens & Meyerhof, 2011).

El patrón de expresión de los receptores T2R tiene implicaciones en la codificación del sabor amargo. Parece que la expresión de múltiples T2Rs en la misma célula receptora del sabor es consistente con los datos de discriminación conductual y generalización en mamíferos que sugieren una percepción gustativa idéntica de calidad de diferentes compuestos amargos y con los datos neurofisiológicos que muestran que diferentes estímulos de sabor amargo activan grupos similares de neuronas en ratas y primates.

Por otra parte, la expresión de diferentes T2R en diferentes células gustativas receptoras es coherente con varios estudios que sugieren que el sistema gustativo puede discriminar entre diferentes estímulos de sabor amargo. Se propuso que una discrepancia entre la expresión de múltiples T2Rs en las mismas células receptoras y las respuestas selectivas de estas células a los estímulos amargos podría deberse a diferencias en los niveles de expresión del mismo T2R en diferentes células gustativas receptoras. Esto daría lugar a una variación entre las células de expresión T2R individuales en su sensibilidad a los compuestos amargos, aunque cada una de estas células receptoras del sabor todavía responderían a múltiples ligandos amargos.

El número de compuestos que perciben los humanos como amargos es mucho más grande que el número de genes TAS2R, lo que implica que cada receptor T2R responde a más de un ligando. Sin embargo, algunos receptores se conocen por tener una restringida especificidad, lo que sugiere que los distintos alelos T2R tienen diferentes perfiles de especificidad. Así, el repertorio de receptores del sabor amargo puede no estar limitado por un número de genes, pero puede involucrar tantos receptores como alelos T2R haya.

Se han identificado ligandos para un número relativamente pequeño de T2Rs en 4 especies de vertebrados. Todos los compuestos que interactúan con receptores T2R evocan sensaciones de amargor.

RECEPTOR TAS2R16

El receptor del sabor amargo TAS2R16 es un receptor acoplado a proteínas G que contiene 291 aminoácidos. En la Figura 5 se muestra la estructura primaria de este receptor.

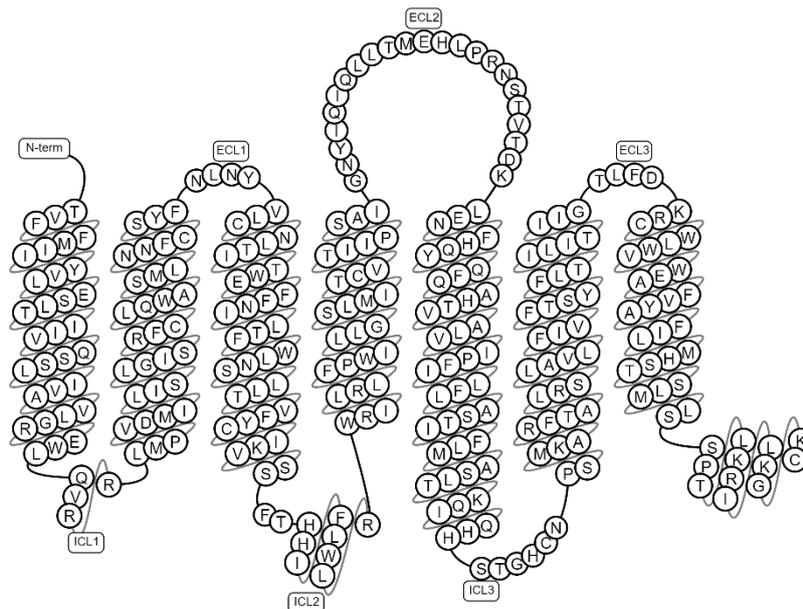


Figura 5: Estructura primaria del receptor del sabor amargo TAS2R16. Modelo del 03/09/2019 (GPCRdb)

La información disponible sobre el tipo de ligandos a los que se acopla este receptor es limitada. Tampoco se conoce la estructura tridimensional de este receptor, pero en base a numerosos estudios y por homología a otras estructuras de parientes lejanos que sí son conocidas, se han propuesto varios modelos.

En un estudio reciente (Thomas, y otros, 2017) se llevó a cabo un análisis estructura-función de este receptor en el que se identificaron 13 residuos que contribuyen a la interacción específica del ligando y 38 cuya mutación elimina la señal de transducción de todos los ligandos, proporcionando una exhaustiva evaluación de cómo están GPCR se acoplan y transmiten la señal.

Para realizar el estudio de las bases estructurales de la activación del receptor del sabor amargo y la selectividad del ligando, crearon una biblioteca de mutaciones de variantes del receptor con un total de 573 clones individuales TAS2R16, representando un promedio de 2 sustituciones de cada aminoácido.

Para la preparación de la biblioteca construyeron un vector de expresión eucariota TAS2R16 de codificación completa con una etiqueta epitópica N-terminal FLAG, una secuencia de señal SST3 y una epitópica C-terminal V5. Utilizando este constructo como plantilla, crearon una biblioteca de mutaciones aleatorias utilizando un método basado en el método PCR “*Shotgun mutagenesis*” para el que todos los aminoácidos fueron mutados. Cada clon se secuenció completamente y 21 residuos que no fueron mutados aleatoriamente, se cambiaron por alanina por mutagénesis dirigida. Los clones que exhibieron de una a tres sustituciones en la región de codificación fueron los seleccionados para crear la biblioteca de mutaciones formada por 573 plásmidos mutantes del TAS2R16 con sustituciones en los 291 residuos.

Todos los receptores mutantes de la biblioteca y los controles se expresaron en células HEK-293T en placas de 384 pocillos. Veinticuatro horas después de la transfección las células se lavaron, se suspendieron y se fijaron con paraformaldehído. Para determinar la expresión total de las células se permeabilizaron con PBS++ y se incubaron con anticuerpos. Tras las incubaciones midieron la fluorescencia de anticuerpos por citometría de flujo en un sistema de cribado HTFC. Las reactividades FLAG y V5 para los clones se normalizaron a los valores obtenidos por los TAS2R16 naturales (“*wild-type*”).

Primero las mutaciones transfectadas fueron evaluadas para la dependencia de la activación con salicina con un ensayo de flujo de Ca^{2+} . Los ensayos de flujo de calcio son comúnmente utilizados para medir la función de las GPCRs, así esta medida representa una función clave del receptor. La adición de salicina a células que expresan el gen TAS2R16 naturales dio lugar a una fuerte activación del receptor.

Se evaluaron todas las variantes del gen TAS2R16 de forma independiente hallando 39 posiciones para las que se observó una reducción significativa de la activación por salicina sin interrumpir el tráfico superficial del receptor, el 90% de estos residuos situados en los dominios TM. También hallaron 17 variantes que dieron lugar a una disminución de la actividad superficial, situados principalmente en la TM1 y la TM2.

Puesto que los receptores de sabor amargo necesitan responder a miles de diferentes estructuras químicas para detectar la gama de compuestos naturales amargos y potencialmente tóxicos presentes en el medio ambiente y con el fin de ayudar a definir las características estructurales del ligando TAS2R16 que confieren especificidad, primero probaron la actividad agonista de un panel de doce análogos de salicina fácilmente disponibles que representan cambios estructurales específicos en los constituyentes del núcleo β -glucósido (grupos R, unión glicosídica y unidades monosacáridas). Seis de los doce análogos demostraron una activación de

moderada a fuerte de TAS2R16 de los cuales se seleccionaron 3 para la caracterización adicional por la diversidad en sus estructuras: 4-nitrofenil- β -D-manopiranososa (en adelante 4-NP- β -manosa), hexil- β -D-glucopiranososa y β -glucosaminida. Fueron seleccionados para proporcionar diferentes tipos y tamaño del grupo R, una gran sustitución en la fracción de azúcar. Aunque el TAS2R16 tiene una serie de restricciones en el reconocimiento de ligandos, como no responder a β -galactosas, la activación del receptor por 4-NP- β -manosa demuestra que la detección de sustrato no se limita a β -glucósidos, lo que sugiere que TAS2R16 tiene un amplio papel en la detección del sabor amargo.

Para entender cómo los ligandos estructuralmente distintos pueden activar de manera similar al TAS2R16, examinaron cada uno de los cuatro ligandos contra toda la biblioteca de mutaciones del TAS2R16, como la salicina, lo que les permitió distinguir cómo cada uno de los cuatro ligandos interactúa con el receptor. Las comparaciones de pares entre ligandos para sus actividades de flujo Ca^{2+} identificaron mutaciones críticas responsables de respuestas diferenciales de ligandos. La incapacidad de un ligando para señalar con una variante particular de TAS2R16 implica que el residuo mutado asociado contribuye al reconocimiento de ese ligando específico. En total, 13 mutaciones críticas demostraron efectos específicos del ligando (2,5 veces la diferencia en la actividad para al menos una comparación por parejas del ligando). Los 13 residuos identificados se colocan en el lado extracelular de los dominios transmembrana o en los bucles ECL, en consonancia con la ubicación propuesta de los sitios de unión a ligandos de los receptores TAS2R y otros GPCR.

Por otro lado, se identificaron 38 residuos críticos necesarios para la señalización de los cuatro ligandos. Sorprendentemente, estos eran idénticos a los 39 residuos identificados como críticos para la señalización de salicina, excepto uno.

Puesto que no existen estructuras cristalinas para las TAS2Rs, la visualización de los residuos críticos la realizaron en un modelo de homología estructural. Los resultados sugerían un modelo en el que los ligandos se unían a un sitio activo inusualmente amplio expuesto en el lado extracelular y la transducción de señales mediadas a través del GPCR a través de residuos conservados en los dominios TM.

En el presente trabajo, se ha llevado a cabo un análisis estructural exhaustivo del impacto de dichos residuos en la unión a los cuatro ligandos citados, mediante estudios computacionales del *docking* a partir de un modelo actualizado de TAS2R16.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de las bases moleculares de la percepción de gusto amargo

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar estructuralmente la localización de residuos funcionalmente relevantes en un modelo molecular actualizado de TAS2R16.
2. Modelar la unión de TAS2R16 a compuestos representativos relacionados con el sabor amargo mediante simulaciones computacionales de *docking*.
3. Estudiar el impacto de mutaciones conocidas en la unión a los diferentes compuestos en base a los modelos obtenidos

MÉTODOS

LINUX

Todos los cálculos y simulaciones realizadas en este trabajo han sido llevadas a cabo en el Sistema Operativo Linux. Puede usarse mediante un interfaz gráfico al igual que Windows o MacOS, pero su principal potencial para aplicaciones científicas es que permite realizar todas las operaciones necesarias mediante línea de comandos.

Una de las ventajas de poder manejar por comandos los programas que se van a utilizar, es que, al no tener que usar la interfaz gráfica de éstos la velocidad del proceso es mucho mayor, y se puede automatizar la gestión de ficheros *input* y *output*, para su aplicación a un gran número de datos.

Es importante el manejo del centro de mando de este SO, por eso se creó un sistema de carpetas para organización de la información y una serie de listas para la familiarización con comandos como `cd` (cambiar de carpeta), `mkdir` (crear carpeta), `cp` (copiar), `mv` (mover), `rm` (eliminar), `sed` (sustituir, realizar listas...), `grep` (buscar), `awk` (función de Excel) ...

BASES DE DATOS

En este trabajo ha sido fundamental la obtención de información de diferentes bases de datos, que son una herramienta esencial en cualquier trabajo de investigación en biología molecular computacional.

La base de datos GPCRdb (<https://www.gpcrdb.org/>) contiene datos, diagramas y herramientas web que resultan útiles para el análisis estructural de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Se pueden explorar todas las estructuras de GPCR y las colecciones más grandes de receptores mutantes. Los diagramas se pueden producir y descargar para ilustrar los residuos del receptor y las relaciones. Los alineamientos de secuencias basadas en estructuras de referencia tienen en cuenta las protuberancias y constricciones de la hélice, muestran estadísticas de conservación de aminoácidos y se les ha asignado una numeración genérica de residuos para residuos equivalentes en diferentes receptores. Esta base de datos ha proporcionado los modelos del receptor TAS2R16 humano, en su forma activa e inactiva. Para el estudio se ha utilizado el modelo del receptor TAS2R16 en su forma activa depositada el 14 de marzo de 2019.

BitterDB (<http://bitterdb.agri.huji.ac.il/dbbitter.php>) es una base de datos que reúne información sobre compuestos naturales y sintéticos de sabor amargo, y sus receptores afines de sabor amargo (T2R o TAS2R).

PubChem (<https://pubchemdocs.ncbi.nlm.nih.gov/about>) es una base de datos de química abierta de los Institutos Nacionales de Salud (NIH). Contiene principalmente moléculas pequeñas, pero también moléculas más grandes como nucleótidos, carbohidratos, lípidos, péptidos y macromoléculas modificadas químicamente. Recopilan información sobre estructuras químicas, identificadores, propiedades químicas y físicas, actividades biológicas, patentes, salud, seguridad, datos de toxicidad y muchos otros. Además de dar información sobre los cuatro ligandos (salicina, hexil- β -glucósido, 4-NP- β -manósido y β -glucosaminida) necesarios para el estudio, también ha proporcionado sus estructuras en 2 dimensiones (2D) y 3 dimensiones (3D).

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y VISUALIZACIÓN DE MUTACIONES.

ICM (http://www.molsoft.com/icm_browser.html) es un programa completo de modelado molecular que proporciona a biólogos o químicos acceso directo a la biología estructural y a las familias de proteínas. Lee una gran variedad de formatos de archivo directamente de los sitios web de las bases de datos, incluidos: PDB, chemical, mapas de densidad electrónica, archivos de secuenciación y alineamiento. También proporciona representaciones potentes de proteínas, ADN y ARN, y alineaciones de secuencias múltiples.

El visualizador de moléculas de ICM se puede controlar de forma interactiva desde la interfaz gráfica del usuario (GUI, por sus siglas en inglés) o por comandos desde la terminal del SO. Para visualizar el receptor primero se carga el archivo al programa con el comando `read pdb` y se asigna la estructura secundaria para visualizar correctamente la disposición de los aminoácidos y los puentes de hidrógeno que forman entre sí dando forma a las hélices transmembrana. Con la proteína preparada, se realiza una lista con los residuos del receptor mutados experimentalmente que han modificado la señal. La lista se utilizará para señalarlos en la proteína previamente cargada, es decir, para mapearlos.

Se han ejecutado distintas representaciones que permiten realizar un análisis inicial rápido con los comandos `cpk`, `xstick` y `surface`.

CÁLCULOS DE DOCKING ENTRE PROTEÍNA Y LIGANDO.

Llamamos *docking* (acoplamiento, encaje o ataque) a una serie de técnicas computacionales para modelar la unión de un ligando con una proteína. En este trabajo, se han llevado a cabo simulaciones de *docking* con el programa Glide, usando la plataforma Schrödinger, que integra soluciones para modelado predictivo, análisis de datos y colaboración para permitir la exploración rápida del espacio químico.

Antes de realizar los cálculos de *docking* con Glide, es necesario preparar tanto la proteína como los ligandos. La preparación de la proteína consiste en acotar el centro activo en la proteína mediante dos cajas cúbicas, una dentro de otra, para fijar los límites del espacio que explorarán los ligandos. La caja interior se ha definido aquí alrededor del centro activo de la proteína, usando dos tamaños diferentes, de 10 y 15 Angstroms, respectivamente. Los centros de masas de los ligandos no podrán salir de dicha caja. La caja exterior define los límites de la exploración de los ligandos, y hemos probado 8 tamaños de caja distintos que se explicarán con más detalle en el apartado de resultados.

Los ligandos se han obtenido de la base de datos PubChem. Se han descargado las moléculas en 2D de los ligandos salicina, hexil- β -glucósido, 4-NP- β -manosido y β -glucosaminida. Para introducir un mayor grado de flexibilidad conformacional y hacer las simulaciones de *docking* más realistas, se necesita generar el mayor número posible de conformaciones en los ligandos estudiados, para que estos interactúen con la proteína de la forma más real posible. Esto se ha llevado a cabo mediante “*ligprep*” de Glide (Friesner, y otros, 2003).

Finalmente se realizan los cálculos de *docking*. Glide lleva a cabo una búsqueda sistemática completa del espacio conformacional, rotacional y posicional del ligando en relación con la proteína. La búsqueda tiene una fase inicial de posicionamiento y puntuación aproximada que reduce el espacio de búsqueda, seguida de la optimización de la energía de unión y la posterior clusterización de los resultados de *docking*. (Friesner, y otros, 2003). Glide proporciona una puntuación a cada modelo obtenido en base a la energía de interacción, lo que permite generar un ranking de las mejores poses para cada ligando.

AGRUPACIÓN DE RESULTADOS (*CLUSTERING*).

Para facilitar el análisis de resultados de *docking*, y eliminar modelos redundantes, es conveniente llevar a cabo un agrupamiento (*clustering*) de los modelos de *docking* en base a la similitud química o a cualquier otra medida de distancia. Para ello, aquí hemos usado los resultados de *docking* con la extensión `.sdf` como ficheros de entrada para el *clustering*, que se ha llevado a cabo mediante la adaptación de un protocolo de ICM previamente desarrollado en el grupo de investigación del Dr. Juan Fernández Recio para el análisis de resultados de *docking*. Se ha realizado una agrupación en función de la RMSD entre todos los resultados de *docking* de cada uno de los ligandos proporcionando una lista más reducida de los grupos representativos de los modelos de *docking* para su posterior análisis.

RESULTADOS

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS MUTACIONES QUE AFECTAN A LA FUNCIÓN

Como se ha mencionado en la introducción, en un estudio reciente (Thomas, y otros, 2017) se mutaron todas las posiciones del receptor del gusto amargo TAS2R16 y se analizó su efecto en la unión de una serie de ligandos. Thomas y otros utilizaron un modelo estructural del receptor obtenido de la base de datos GPCRdb a fecha de dicho estudio, dado que su estructura 3D no estaba disponible. Pero dicho modelo presentaba inconsistencias en algunos datos. En nuestro trabajo, el primer objetivo ha sido usar un modelo estructural más actualizado para explicar mejor los datos experimentales y que pueda ser utilizado para estudiar la unión a compuestos amargos. Para ello, se ha partido de un modelo estructural de TAS2R16 actualizado, depositado en marzo de 2019 en la base de datos GPCRdb (ver Métodos).

En el citado estudio encontraron una serie de mutaciones que modificaban la señal: 38 eliminaban la señal de transducción para todos los ligandos, y 13 de ellas eran específicas de cada ligando. La Figura 6 muestra la localización de dichos residuos funcionalmente importantes en el modelo estructural de TAS2R16 actualizado, representando simplemente los carbonos *alpha* ($C\alpha$). Todos ellos aparecen localizados en dominios estructurados (las hélices transmembrana), con una acumulación de residuos importantes en el lugar estimado del sitio activo.

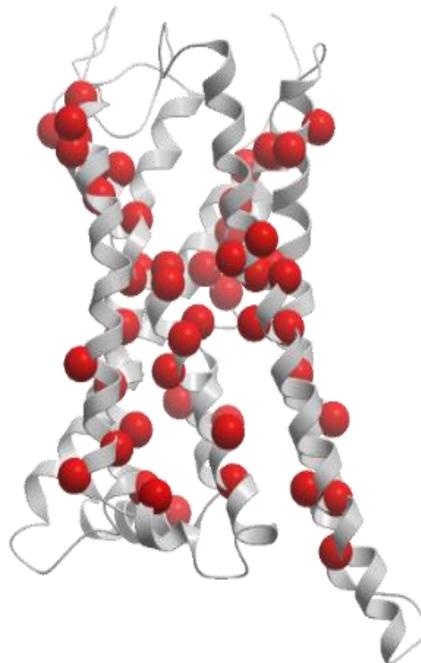


Figura 6: Se representan los $C\alpha$ de los residuos mutados que han producido una modificación en la señal en un estudio previo (cpk en rojo). En gris se representa la estructura del receptor TAS2R16

En la Figura 7 se muestra una representación más detallada de cada residuo completo con la posición de la cadena del aminoácido correspondiente. Esto permite visualizar los residuos que presentan las cadenas hacia el interior del canal y que pueden dificultar el acceso al sitio activo o simplemente formar parte de él.

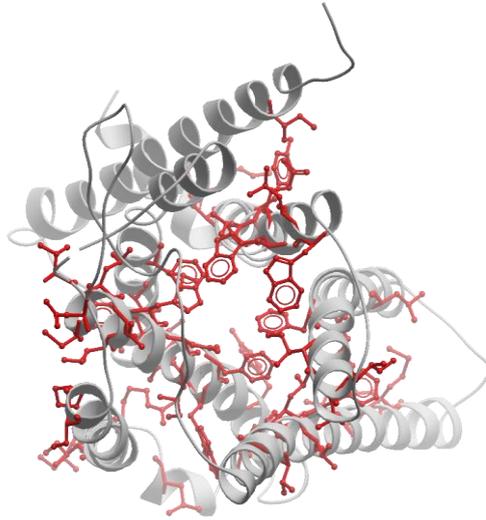


Figura 7: Residuos funcionalmente relevantes (en rojo) representados en el receptor TAS2R16 (en gris) con una perspectiva del interior del canal.

En la Figura 8 se muestran los mismos residuos sobre una representación de la superficie expuesta al solvente del receptor TAS2R16, en la que se visualiza de forma eficaz aquellos residuos que están directamente en la superficie de la cavidad, lo que resulta útil para la identificación y evaluación rápida de la posición de los residuos y lo que su mutación puede suponer.

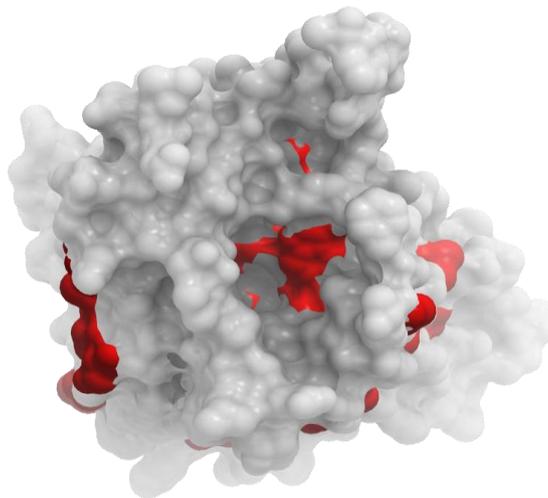


Figura 8: Representación de la superficie del receptor TAS2R16 (en gris) con los residuos cuya mutación produce una modificación de la señal (en rojo).

En la Figura 9 se observa una representación de la estructura primaria del modelo del receptor previamente utilizado para el estudio anteriormente citado, con la visualización de las mutaciones más relevantes. Algunas de éstas se encuentran en los bucles (*loops*), lo que presenta inconsistencia con los resultados hallados experimentalmente. Sin embargo, en el modelo actualizado, todas las mutaciones se localizan en los dominios transmembrana (Figuras 6-8) lo que indica que el modelo utilizado en el presente trabajo presenta mayor consistencia con los resultados experimentales.

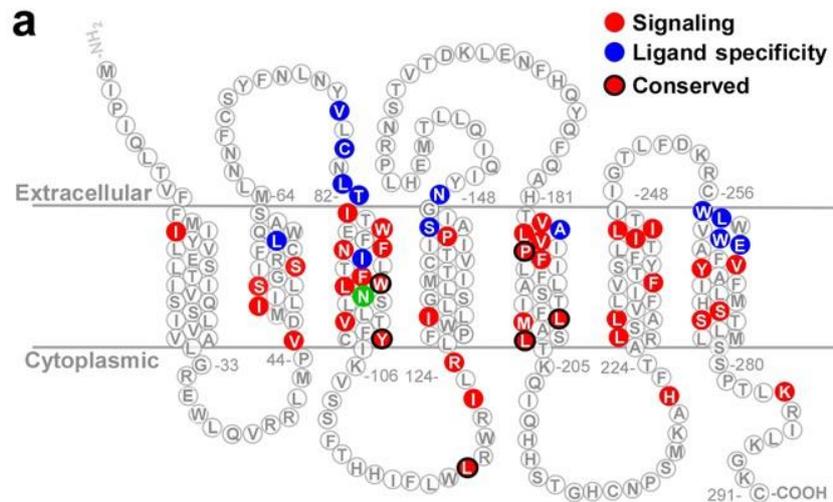


Figura 9: Visualización de las mutaciones en la estructura primaria del modelo del receptor TAS2R16 previamente utilizado para el estudio mutacional (Thomas, y otros, 2017).

MODELADO ESTRUCTURAL DE LA UNIÓN DEL RECEPTOR A LIGANDOS

El siguiente objetivo del trabajo ha sido usar el modelo estructural de TAS2R16 descrito en la sección anterior para estudiar la unión a los diferentes sustratos mediante simulaciones de *docking* con Glide (ver Métodos).

Para ello, se ha diseñado un nuevo protocolo adecuado a la exploración de diferentes condiciones para el *docking* de ligandos al receptor TAS2R16. El primer paso ha sido estimar la localización del centro activo del receptor, en base a las 13 mutaciones *in vitro* que, según el estudio experimental de Anu Thomas y otros (2017), afectan a la especificidad del ligando.

En la Figura 10 se representa el punto medio (centro de masas) de las 13 mutaciones citadas, y que ha sido usado para definir dos cajas cúbicas, una interior y otra exterior, que definirán el espacio de exploración del ligando durante el *docking* (ver Métodos).

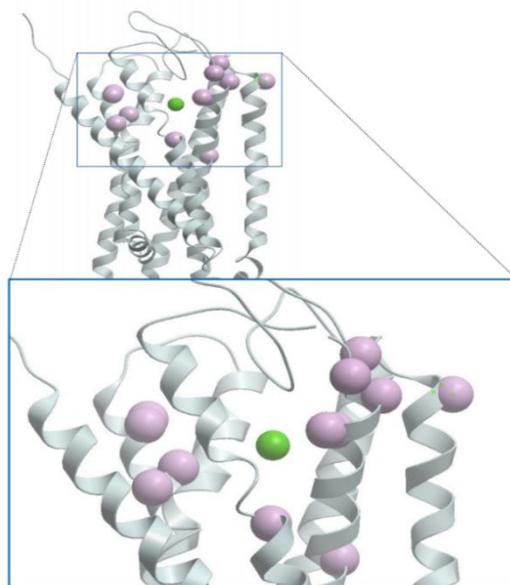


Figura 10: Representación del centro de masas (en verde) de las mutaciones de TAS2R16 que se ha determinado que afectan a la especificidad del ligando (en lila).

La caja interior es la que focaliza el centro activo de la proteína, y define la región espacial en la que se situaran los centros de masas de los ligandos durante las simulaciones de *docking*. Para dicha caja interior, centrada en dicho centro de masas, se han probado dos tamaños, de lados 10 y 15 Å, respectivamente.

La caja exterior define los límites de la región espacial donde se permite localizar las coordenadas de los átomos de los ligandos durante las simulaciones de *docking*. Se han probado diferentes tamaños de dichas cajas. La más pequeña se ha definido para medir de lado dos veces la distancia del centro de masas al residuo más alejado (39 Å), y a partir de ella, se han definido otras cajas de tamaño mayor aumentando esta distancia sucesivamente de 5 en 5 Å (hasta 74 Å).

De esta forma, se han determinado un total de 16 cajas cuyas medidas se recogen en la Tabla 1:

Tabla 1: Dimensiones de las cajas generadas

	CAJA INTERIOR 1 (10x10x10 Å³)	CAJA INTERIOR 2 (15x15x15 Å³)
CAJA EXTERIOR 1	39x39x39 Å ³	39x39x39 Å ³
CAJA EXTERIOR 2	44x44x44 Å ³	44x44x44 Å ³
CAJA EXTERIOR 3	49x49x49 Å ³	49x49x49 Å ³
CAJA EXTERIOR 4	54x54x54 Å ³	54x54x54 Å ³
CAJA EXTERIOR 5	59x59x59 Å ³	59x59x59 Å ³
CAJA EXTERIOR 6	64x64x64 Å ³	64x64x64 Å ³
CAJA EXTERIOR 7	69x69x69 Å ³	69x69x69 Å ³
CAJA EXTERIOR 8	74x74x74 Å ³	74x74x74 Å ³

Para cada una de las 16 cajas anteriormente descritas, se han llevado a cabo simulaciones de *docking* usando 32 conformaciones aleatorias distintas generadas para cada uno de los cuatro ligandos estudiados (ver Métodos). En total, se han llevado a cabo $16 \times 32 \times 4$ simulaciones diferentes de *docking*.

En general, los modelos obtenidos de las simulaciones de *docking* para los diferentes ligandos y en todas las condiciones probadas, se sitúan de forma consistente en torno al centro activo previsto del receptor TAS2R16. Esto puede considerarse como una primera indicación del que el modelo estructural de TAS2R16 utilizado es razonable. La Figura 11 representa las 100 mejores orientaciones de *docking*, ordenadas de acuerdo con la energía de interacción calculada por Glide, para el ligando salicina, considerando una caja interior de 15 Å y una exterior de 39 Å. Se observa que todos estos modelos se localizan en la misma región espacial. Los resultados no varían mucho si usamos la caja interior de 10 Å (Figura 16A, Anexo), o los otros tamaños de caja exterior (Figuras 16 y 17, Anexo). Los modelos resultantes para los otros sustratos no presentan tampoco grandes diferencias en cuanto al tamaño de cajas utilizado (Figuras 18 y 19, Anexo).

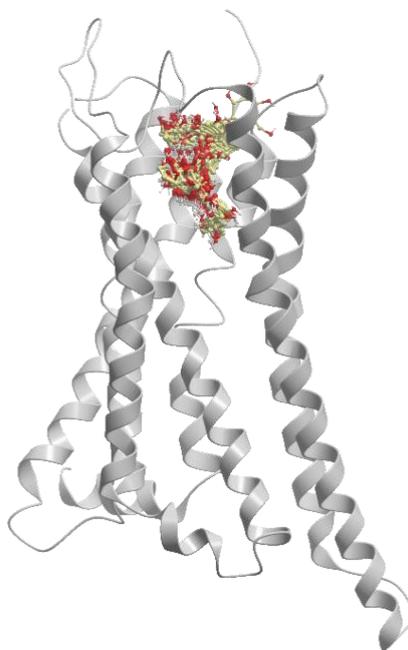


Figura 11: Representación de los 100 resultados de la Salicina (en ocre y rojo) con mejor resultado en el receptor TAS2R16 (en gris) para la caja de 39 y 15 Å

De acuerdo con los resultados de *docking* observados, para simplificar los análisis posteriores hemos decidido seleccionar la caja interior de $15 \times 15 \times 15$ Å³, que permite una exploración más extensa que la de 10 Å de lado, y una caja exterior de 39 Å (el tamaño más pequeño, ya que no presenta diferencias significativas con los otros tamaños).

Resulta interesante comparar los modelos de *docking* obtenidos para la salicina con complejos homólogos de estructura disponible, como son los formados entre dos compuestos de bajo peso molecular y un homólogo estructural de TAS2R16, el receptor de angiotensina humano (PDB 4YAY y 4ZUD). La Figura 12 muestra claramente la posición de los 10 primeros modelos de *docking* de salicina en TAS2R16, muy similar a la posición de los compuestos unidos al receptor de angiotensina.

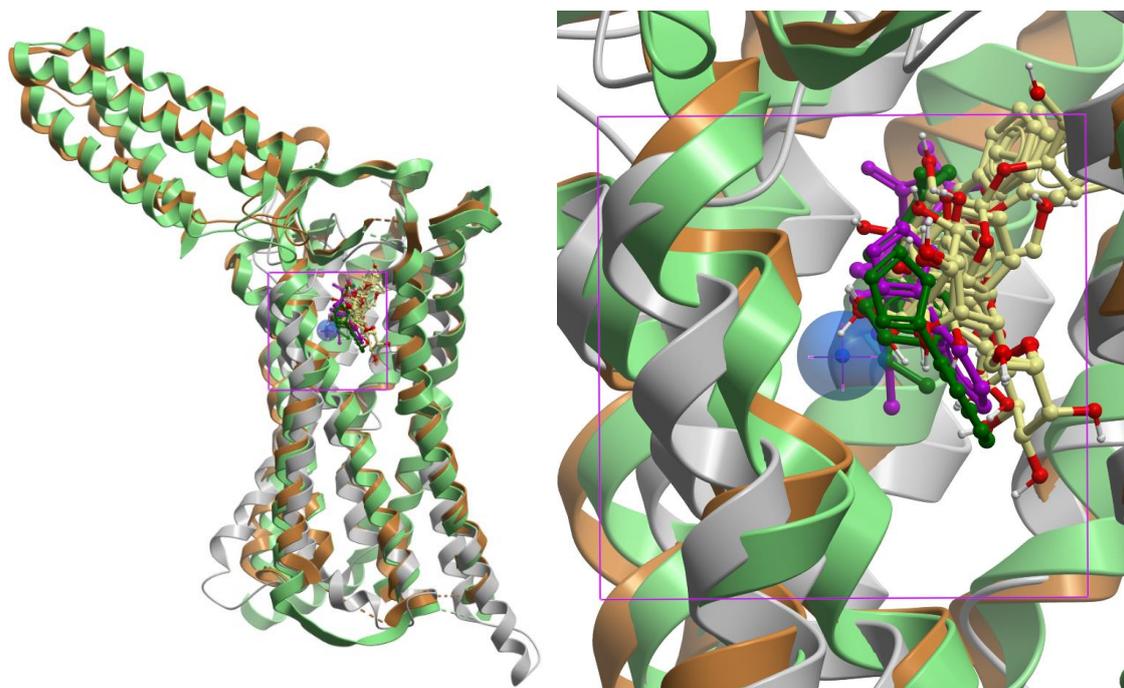


Figura 12: Análisis comparativo de los modelos de *docking* entre salicina y TAS2R16 con complejos homólogos de estructura disponible. Se representan las 10 mejores modelos de *docking* de acuerdo con la energía de Glide (con átomos de carbono en amarillo) y TAS2R16 (en gris), y el receptor de la angiotensina (homólogo estructural de TAS2R16) unido a dos compuestos de bajo peso molecular, con PDB 4YAY (en verde) y 4ZUD (en ocre). Los receptores TAS2R16 y el receptor de la angiotensina se han superpuesto estructuralmente. Se muestra la caja interior usada en el *docking* (en magenta), y el punto (en azul) utilizado para calcular el centro de la caja. En el panel de la derecha se muestra una ampliación de la vista del centro activo para un mayor detalle.

En general, se sabe que esta familia de receptores (GPCRs) presenta el centro activo muy conservado, a pesar de su diversidad de secuencias y funciones. Como se observa en la Figura 12, la salicina en los modelos de *docking* se sitúa en el mismo lugar en el receptor TAS2R16 que otros compuestos de bajo peso molecular que se unen a la angiotensina (homólogo estructural del TAS2R16), lo que indica que la selección de las cajas es correcta y que los resultados de *docking* son razonables.

Para facilitar el análisis de los resultados de las simulaciones de *docking*, eliminando orientaciones repetidas o con muy poca variación entre sí, se ha llevado a cabo el agrupamiento o *clustering* de las 100 orientaciones mejor situadas en el ranking de energías, en base a la RMSD

de las diferentes posiciones del ligando. Es interesante analizar las 10 mejores posiciones de *docking* en cuanto a energía, y diferentes estructuralmente entre sí.

Se ha llevado a cabo mediante la adaptación de la herramienta estándar de *clustering* de complejos de proteínas de CAPRI. La adaptación se realizó a través de un *script* de ICM con un protocolo para generar la matriz comparativa según el tipo de alineamiento entre ligandos con una distancia límite (*cutoff*) de 2 Ångstroms. De esta manera, se consigue un agrupamiento de las poses con un RMSD menor de 2 Å, generando un total de 10 grupos que presentan un RMSD mayor que 2 Å entre sí y que mejor situados están en el ranking, energéticamente hablando.

En la Figura 13 se representa el resultado de *clustering* para la salicina.

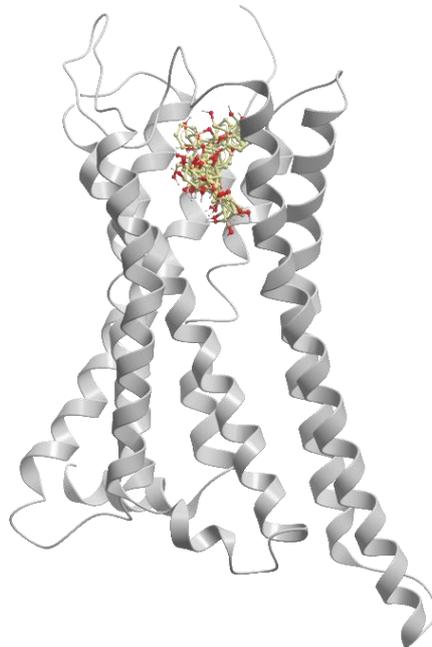


Figura 13: Representación de los 10 resultados de la salicina (en ocre y rojo) con mejor resultado clusterizado en el receptor TAS2R16 (en gris).

IMPACTO ESTRUCTURAL DE MUTACIONES DE TAS2R16 EN LA UNIÓN A LIGANDO

El siguiente objetivo es caracterizar estructuralmente los residuos relevantes funcionalmente según los resultados experimentales del estudio de Anu Thomas (Thomas, y otros, 2017) en cuanto a su posible impacto estructural en la unión a los diferentes ligandos.

En base a los resultados de *docking* obtenidos tras agrupar los modelos relevantes, analizando las distancias entre los residuos funcionales y los ligandos en los modelos de *docking*, se ha estimado cuáles son las mutaciones que podrían afectar a cada ligando. En la Tabla 2 se

muestran cuáles de los 13 residuos que presentan alta especificidad por los diferentes ligandos se encuentran a menos de 6 Å de distancia de los centros de masas de los ligandos correspondientes en cada uno de los diferentes modelos de *docking* representativos.

Tabla 2: Impacto estructural de las mutaciones funcionalmente relevantes en las posiciones de docking representativas para cada ligando (considerando 6 Å de distancia entre residuos y ligandos)

	L59A	V77A	C79R	L81A	T82A	I90T	S144L	N148S	A184V	W257R	L258V	W261G	E262D
Salicina	65 ^a	85	35	95	95	78	65	80	90	25	35	10	90
11^b/1^c	x				x					x		x	
3/1					x					x	x	x	
22/1					x					x		x	
11/5	x			x	x				x	x		x	
22/2				x	x					x		x	
Hexil-β-glucósido	7	55	65	60	55	50	55	85	25	18	25	10	88
11/1	x			x	x					x		x	
31/1					x				x	x		x	
24/1	x			x	x					x		x	
20/1	x				x				x	x		x	
31/2					x					x	x	x	
4-NP- βmanósido	15	30	80	12	25	20	18	75	10	70	7	85	45
15/1	x				x				x	x		x	
20/1	x				x					x		x	
32/1					x					x	x	x	
3/1					x					x		x	
25/1				x	x					x		x	
β-glucosaminida	45	30	10	15	107	70	15	30	30	30	50	5	25
9/1				x	x					x	x	x	
29/1					x					x	x	x	
16/1					x					x		x	
6/1				x	x					x		x	
24/1	x				x					x		x	

^a % de señal de flujo de calcio en relación al WT, determinada experimentalmente (Thomas, y otros, 2017); ^b número identificativo de la conformación del ligando usada en *docking*; ^c ranking del modelo de *docking*. En cada celda de la tabla, se indican los residuos cuyos centros de masas se encuentran a menos de 6 Å del centro de masas del ligando con una "x".

Se han analizado las 5 mejores orientaciones de *docking*, energéticamente hablando, resultantes tras hacer *clustering*. Este análisis permite comparar si los modelos son consistentes con los resultados hallados experimentalmente (Thomas, y otros, 2017). La mayoría de residuos cuya mutación disminuye drásticamente la actividad funcional (ej. ≤25%) están cerca del ligando correspondiente, mientras que la mayoría de los residuos cuya mutación no afecta a la funcionalidad (ej. >25%) se encuentran lejos del ligando. De este modo, el modelo de TAS2R16

usado en este trabajo y los modelos generados para sus interacciones resultan útiles para explicar el efecto funcional de la mayoría de las mutaciones previamente estudiadas experimentalmente. Este análisis está basado en el cálculo de distancias entre centros de masas, que podría no tener suficiente detalle para identificar las interacciones específicas entre átomos. En el futuro, este análisis se podría mejorar calculando distancias mínimas entre átomos de los residuos y los ligandos, en lugar de las basadas en los centros de masas. Además, posiblemente haga falta un análisis energético del impacto de la mutación en el ligando, que será tenido en cuenta en investigaciones futuras.

También se han calculado los residuos que se sitúan a menos de 10 Å (Tabla 3, Anexo), pero con ese *cutoff* no hay suficiente discriminación entre residuos funcionales y no funcionales.

APLICACIÓN A UN CASO DE INTERÉS EN LA QUÍMICA DEL VINO: UNIÓN DE TAS2R16 A LA MALVIDINA-3-O-MONOGLUCÓSIDO.

Como se ha explicado anteriormente, el sabor amargo es determinante en la elección de las opciones dietéticas, lo que tiene importantes repercusiones en salud, y en la industria alimentaria, en particular en el sector vitivinícola.

El sabor amargo es una característica por determinar y valorar cuando se quiere evaluar un vino. Pero la dificultad de esta evaluación radica, como se ha comentado, en las distintas formas de percepción de este gusto.

Muchos compuestos presentes en el vino están identificados como amargos, pero hay otro número considerable que aún no se ha conseguido identificar. Como se ha indicado anteriormente, los antocianos han sido descritos por varios autores (Soares, y otros, 2013; Soares, Brandao, Mateus, & de Freitas, 2017; Sáenz-Navajas, y otros, 2017; Ferrero del Teso, y otros, 2020) como compuestos implicados en el sabor amargo. La malvidina-3-O-monoglucósido, es el antociano mayoritario en uvas *Vitis vinífera* y por lo tanto en los vinos elaborados a partir de ellas.

La estructura de la malvidina-3-O-monoglucósido se muestra en la Figura 14.

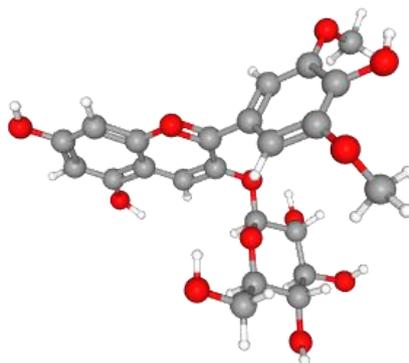


Figura 14: Estructura química de la malvidina-3-O-monoglucósido. (PubChem, 2020)

El grupo de investigación “Ciencia Química y Sensorial Enológica” del ICVV está trabajando en la hipótesis de que los antocianos y, por tanto, la malvidina-3-O-monoglucósido es un compuesto amargo. En colaboración con dicho grupo, se ha considerado interesante aplicar el procedimiento anteriormente descrito, para determinar si la unión de malvidina-3-O-monoglucósido a TAS2R16 es estructuralmente posible, lo que sería consistente con su posible carácter amargo.

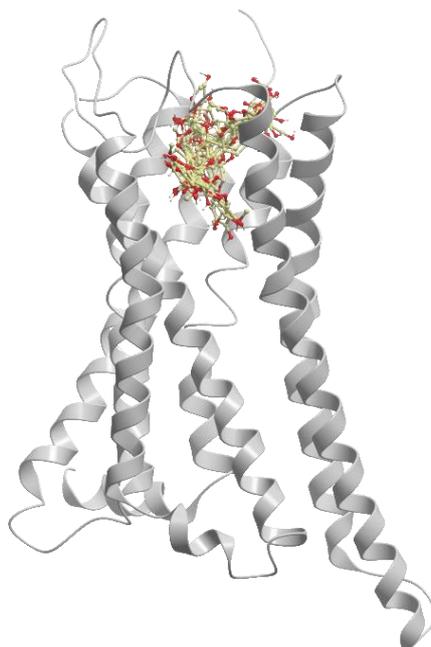


Figura 15: Representación de los 10 resultados con mejor puntuación de las poses clusterizadas de la malvidina-3-O-monoglucósido (en ocre y rojo) en el receptor TAS2R16 (en gris).

Los resultados de las simulaciones de *docking* entre la malvidina-3-O-monoglucósido y el receptor del sabor amargo TAS2R16 indican que este antociano encaja perfectamente en el centro activo del receptor (Figura 15). Aunque serán necesarias más evidencias experimentales y cálculos más exhaustivos, estos primeros resultados sugieren la posibilidad de que la

malvidina-3-O-monoglucósido sea un ligando agonista de TAS2R16, lo que sería consistente con su posible carácter amargo.

CONCLUSIONES

Los receptores del sabor amargo son importantes para la salud humana y la alimentación, y conocer su estructura e interacciones a nivel molecular puede ayudar a entender el impacto de variantes genéticas

El modelo actualizado de TAS2R16 disponible en la base de datos GPCRdb proporciona un mejor marco racional para entender el impacto funcional de mutaciones conocidas

El modelado de la unión de TAS2R16 a ligandos representativos mediante *docking* indica una alta conservación en las orientaciones de los ligandos unidos y es consistente con el sitio activo de otros homólogos de la familia de GPCRs.

Los modelos de *docking* obtenidos permiten estimar el impacto estructural de mutaciones puntuales en la unión a ligandos específicos.

El protocolo de modelado de las interacciones de TAS2R16 desarrollado en este trabajo es un sólido punto de partida para extenderlo a otros receptores de la familia TAS2R en futuras investigaciones.

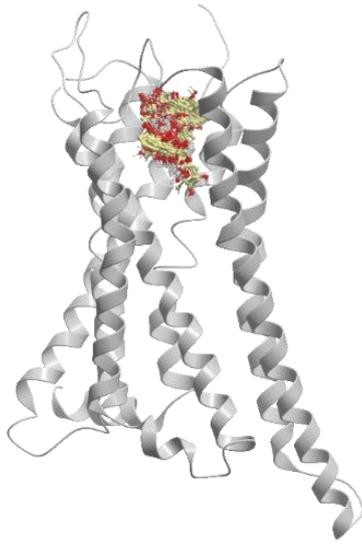
BIBLIOGRAFÍA

- Aragón, G. d. (s.f.). *UD. Funciones de relación y reproducción humana. Salud y enfermedad*.
Obtenido de <http://e-educativa.catedu.es/>
- Bachmanov , A., & Beauchamp, G. (2007). Taste Receptor Genes. *Annual Review of Nutrition*, 389-414. Obtenido de National Insitute of Health.
- Bachmanov, A., Bosak, N., Lin, C., Matsumoto, I., Ohmoto, M., Reed, D., & Nelson, T. (2014). Genetics of Taste Receptors. Current Pharmaceutical Design. *Current Pharmaceutical Design*, 2669-2683.
- Beherens, M., & Meyerhof, W. (2011). Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. . *Physiology & Behavior*, 4-13.
- Chandrashekar, J., Hoon, J., Ryba, N., & Zuker, C. (2006). The receptors and cells for mamalian taste. *Nature*, 444(7117), 288-294.
- Chandrashekar, J., Mueller, K., Hoon, M., Adler, E., Feng, L., Guo, S.-W., . . . Ryba, N. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. . *Cell*, 703-711.
- Ferrero del Teso, S., Suárez, A., Jeffery, D., Ferreira, V., Fernández-Zurbano, P., & Sáenz-Navajas, M. (2020). Sensory variability associated with anthocyanic and tannic fractions isolated. *Food Research International*, 1-9.
- Fox, A. L. (1932). The Relationship Between Chemical Constitution And Taste. *Genetics*, 115-120.
- Friesner, R., Banks, J., Murphy, R., Halgren, T., Klicic, J., Mainz, D., . . . Shenkin, P. (2003). Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assesment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem*, 1739-1749.
- Matsunami, H., Montmayeur, J., & Buck, L. (2000). A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, 601-604.
- Nelson, D., Cuchillo Foix, C., Lehninger, A., & Cox, M. (2005). *Principios de Bioquímica. Lenhinger. 4ª ed.* Barcelona, España: Omega.
- PubChem. (13 de Junio de 2020). *PubChem*. Obtenido de National Library of Medicin: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Malvidin>
- Sáenz-Navajas, M. P., Avizcuri, J. M., Ferrero del Teso, S., Valentín, D., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2017). Chemo-sensory characterization of fractions driving different mouthfeel. *Food Research International*, 54-64.

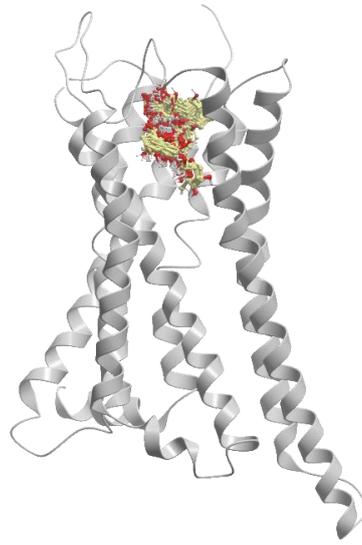
- Soares, S., Brandao, E., Mateus, N., & de Freitas, V. (2017). Sensorial properties of red wine polyphenols: Astringency and bitterness. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 937-948.
- Soares, S., Kohl, S., Thalmann, S., Mateus, N., Meterhof, W., & de Freitas, V. (2013). Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors. *J. Agric. Food Chem.*, 1525-1533.
- Thomas, A., Sulli, C., Davidson, E., Berdoug, E., Phillips, M., Puffer, B., . . . Rucker, J. (2017). The Bitter Taste Receptor TAS2R16 Achieves High Specificity and Accommodates Diverse Glycoside Ligands by using a Two-faced Binding Pocket. *Nature. Scientific Reports*, 1-15.
- Valente, C., Alvarez, L., Marques, P. I., Gusmão, L., Armorim, A., Seixas, S., & Prata, M. J. (2018). Genes from the TAS1R and TAS2R Families of Taste Receptors: Looking for signatures of Their Adaptive Role in Human Evolution. *GBE*, 1139-1152.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentos de bioquímica. La vida a nivel molecular*. Barcelona: Médica Panamericana.

ANEXO

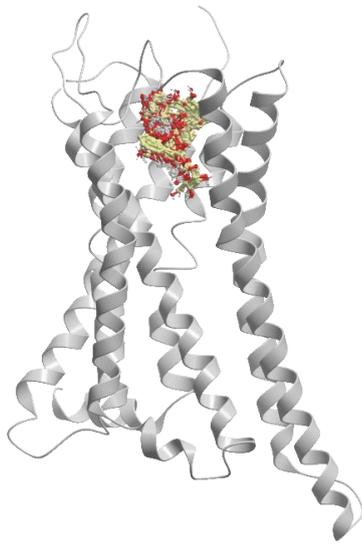
A



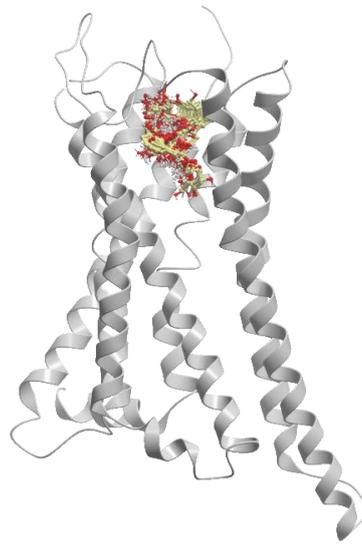
B



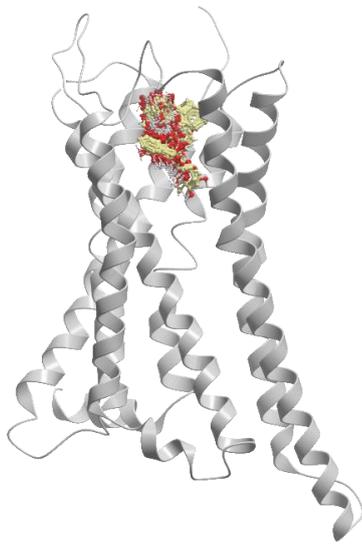
C



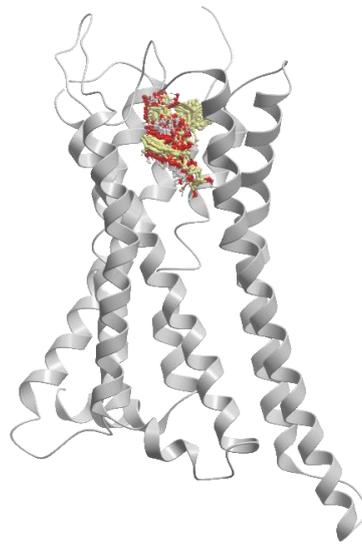
D



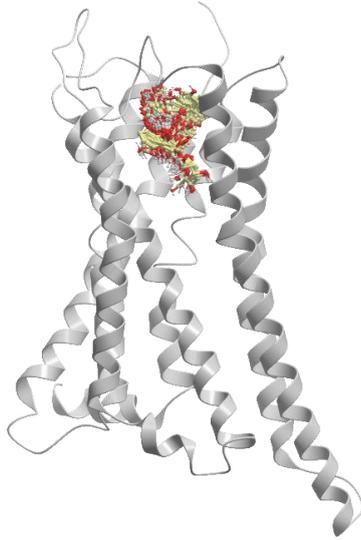
E



F



G



H

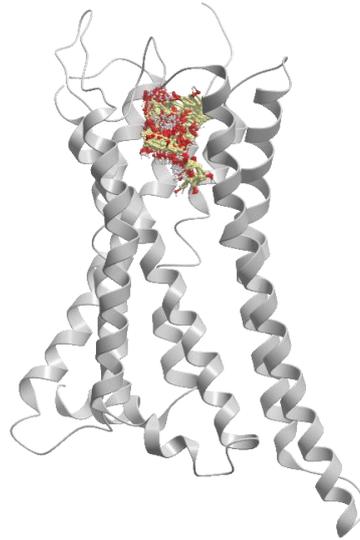
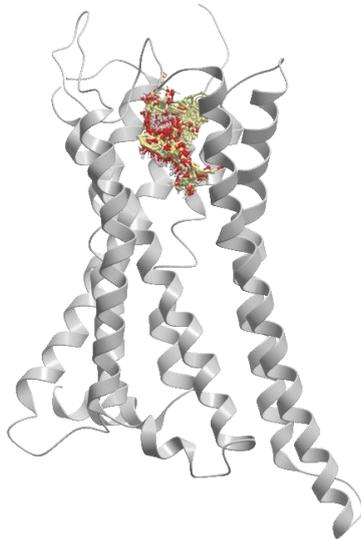
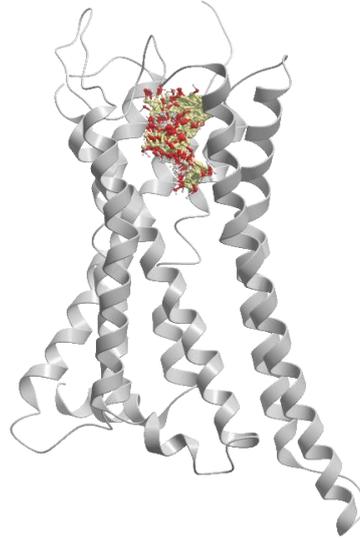


Figura 16: Representación de los 100 resultados de la Salicina (en ocre y rojo) con mejor puntuación en el receptor TAS2R16 (en gris) para las cajas de caja interior 1: A) caja de 39 Å; B) la caja de 44 Å; C) la caja de 49 Å; D) la caja de 54 Å; E) la caja de 59 Å; F) la caja de 64 Å; G) la caja de 69 Å; H) la caja de 74 Å

A



B



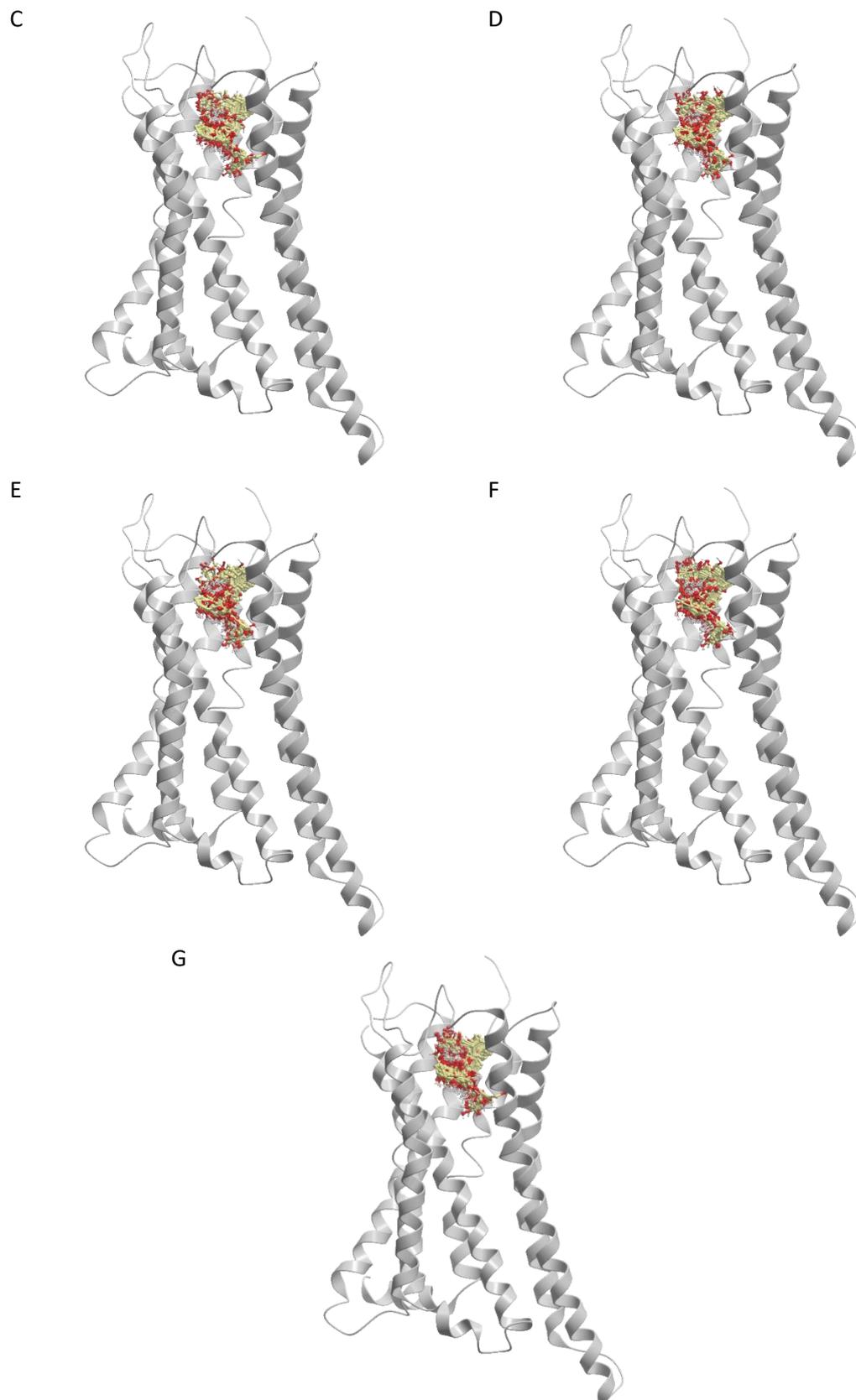


Figura 17: Representación de los 100 resultados de la Salicina (en ocre y rojo) con mejor puntuación en el receptor TAS2R16 (en gris) para las cajas de caja interior 2: A) la caja de 44 Å; B) la caja de 49 Å; C) la caja de 54 Å; D) la caja de 59 Å; E) la caja de 64 Å; F) la caja de 69 Å; G) la caja de 74 Å

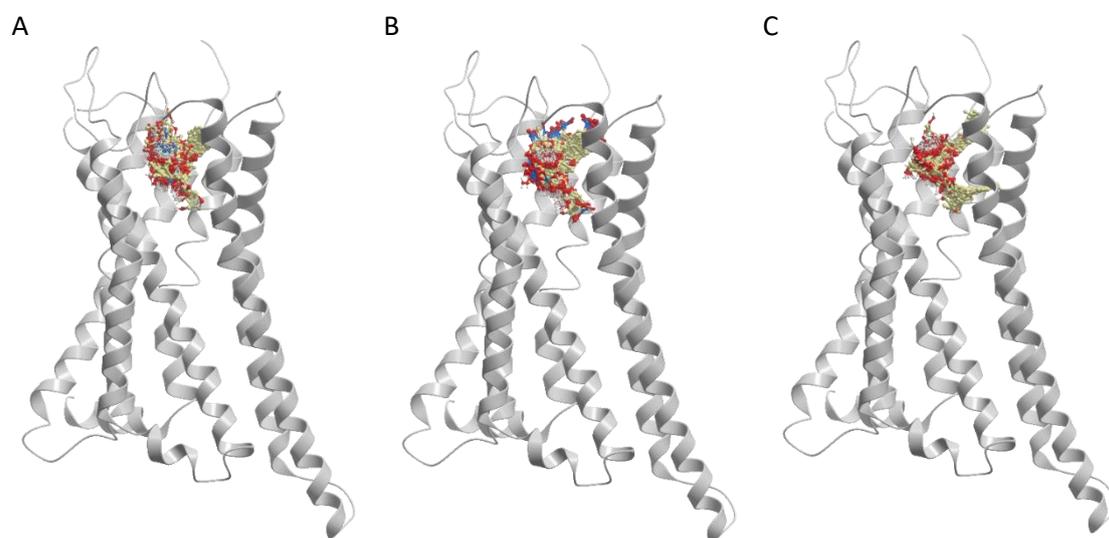


Figura 18: Representación de los 100 resultados con mejor puntuación de los ligandos (A, B y C, en ocre y rojo) en el receptor TAS2R16 para la caja de 39 Å de caja interior 2: A) β -glucosaminida; B) 4-NP- β -manósido; C) hexil- β -glucósido

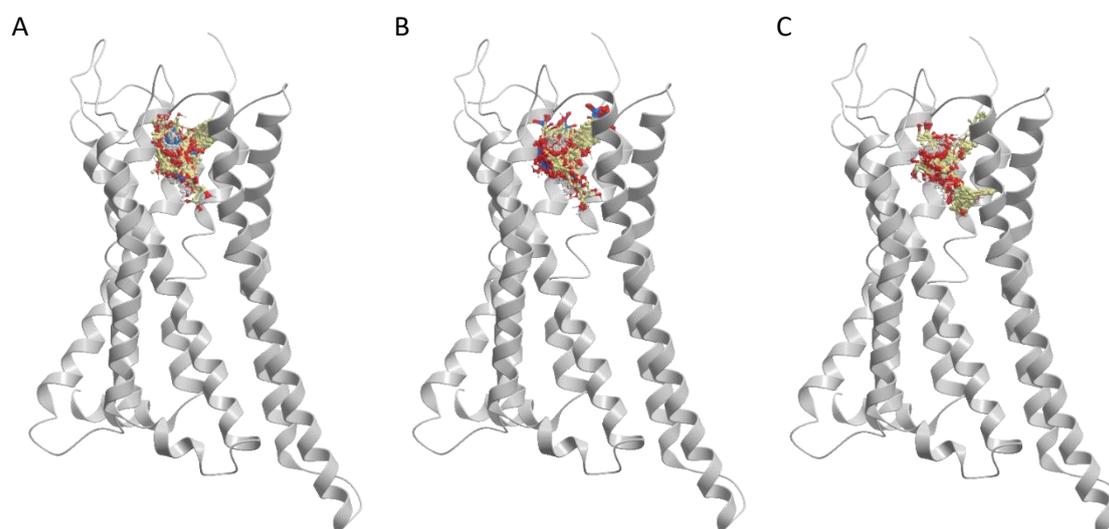


Figura 19: Representación de los 100 resultados con mejor puntuación de los ligandos (A, B y C, en ocre y rojo) en el receptor TAS2R16 para la caja de 74 Å de caja interior 2: A) β -glucosaminida; B) 4-NP- β -manósido; C) hexil- β -glucósido

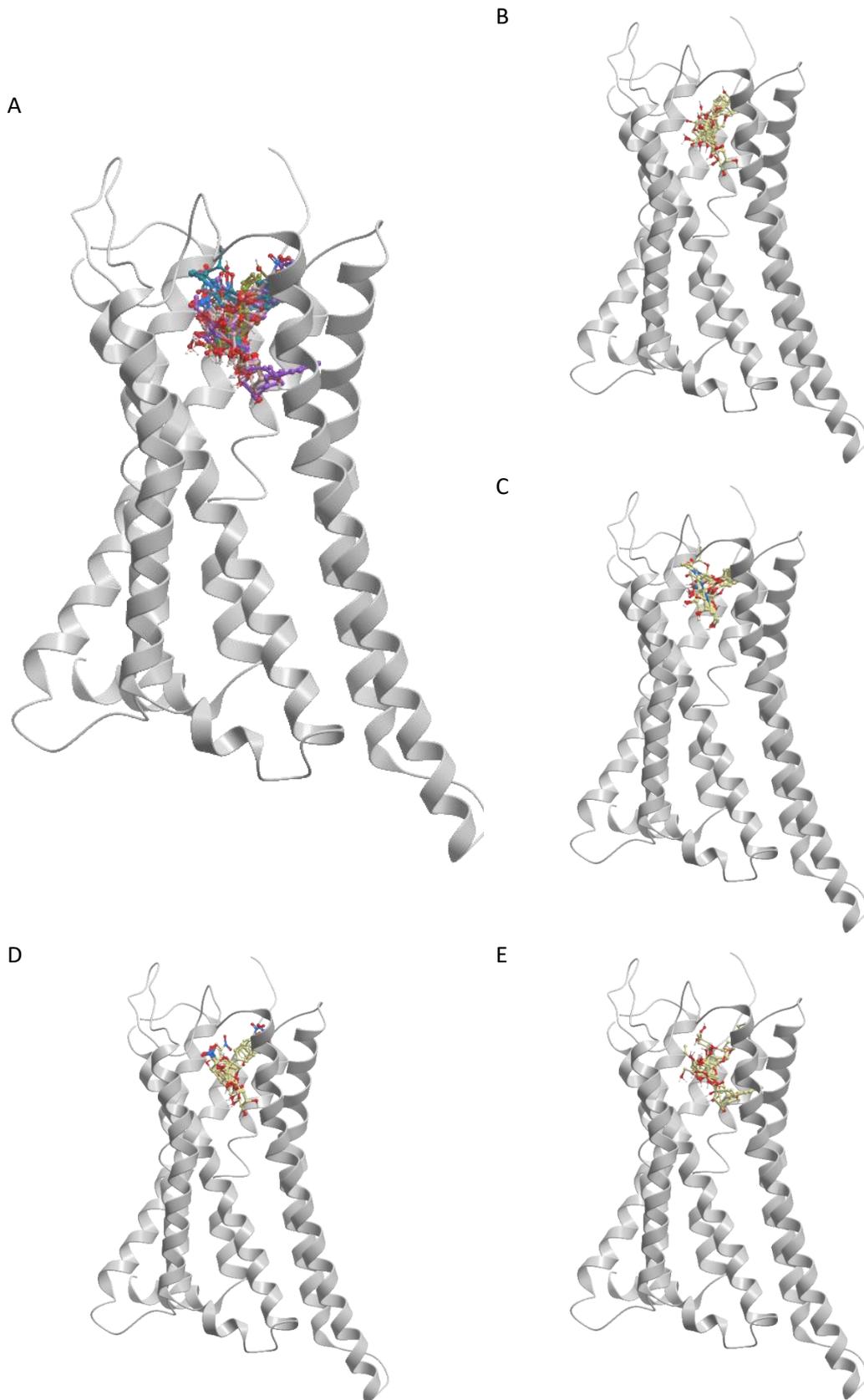


Figura 20: Representación de los 10 resultados con mejor puntuación en el receptor TAS2R16 (en gris) para la caja de 39 Å de caja interior 2 de: A) todos los ligandos B) salicina (en ocre y rojo); C) β -glucosaminida (en ocre y rojo); D) 4-NP- β -manósido (en ocre y rojo); E) hexil- β -glucósido (en ocre y rojo).

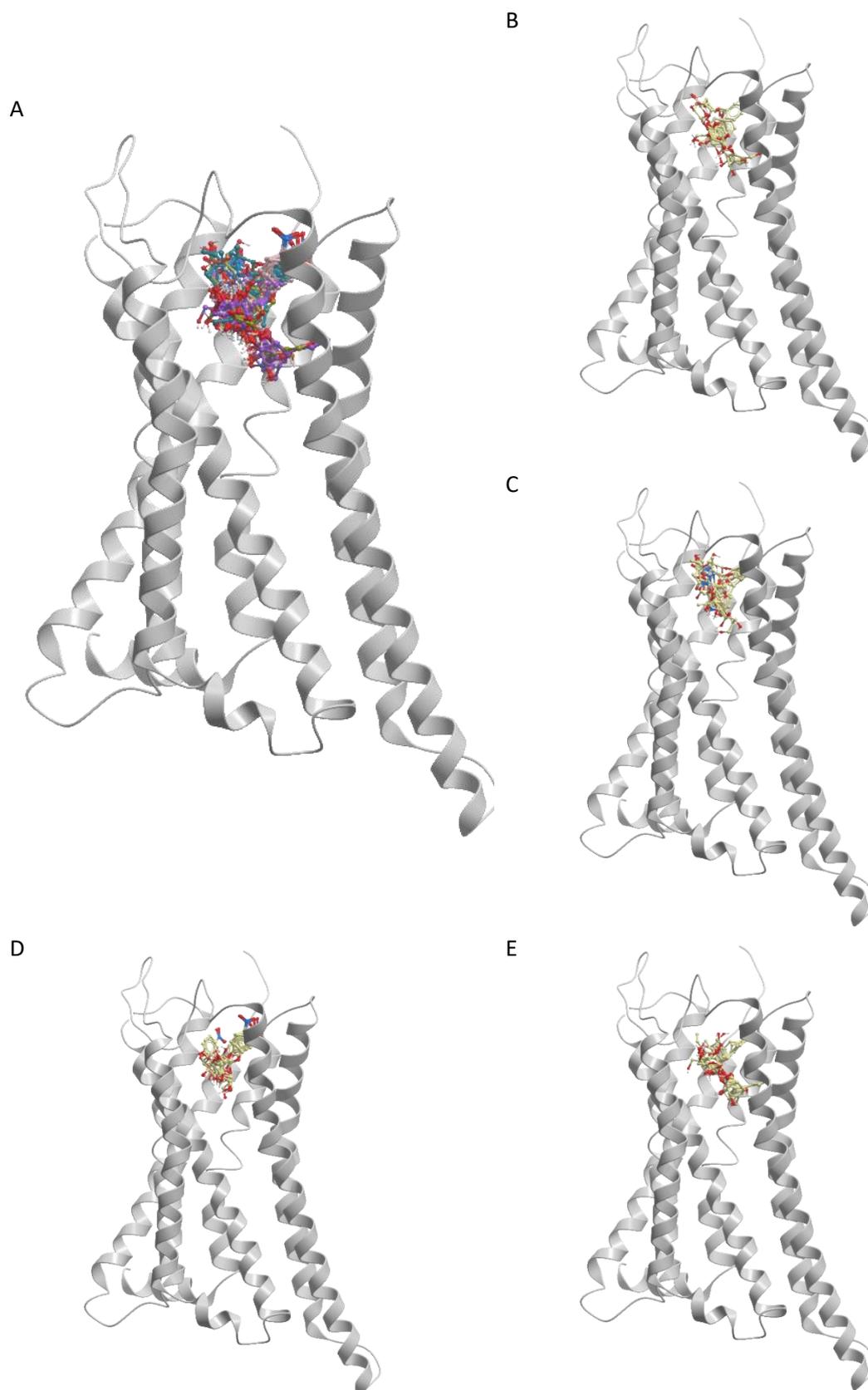


Figura 21: Representación de los 10 resultados con mejor puntuación en el receptor TAS2R16 (en gris) para la caja de 74 Å de caja interior 2 de: A) todos los ligandos B) salicina (en ocre y rojo); C) β-glucosaminida (en ocre y rojo); D) 4-NP-β-manósido (en ocre y rojo); E) hexil-β-glucósido (en ocre y rojo).

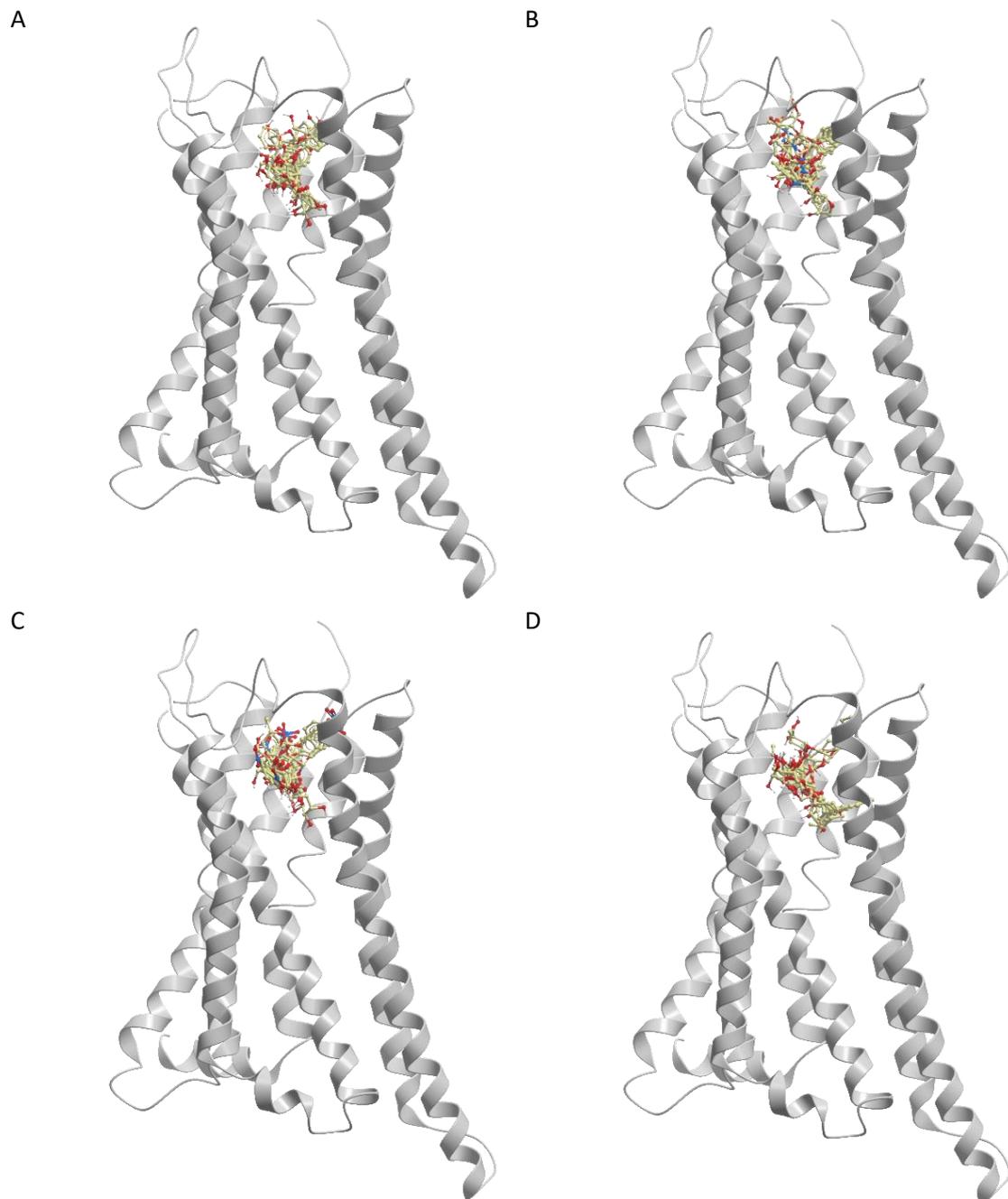


Figura 22: Representación de los 10 resultados de los ligandos (A, B, C y D en ocre y rojo) con mejor resultado clusterizado en el receptor TAS2R16 (en gris): A) salicina; B) β -glucosaminida; C) 4-NP- β -manósido; D) hexil- β -glucósido

Tabla 3: Impacto estructural de las mutaciones funcionalmente relevantes en las posiciones de docking representativas para cada ligando (considerando 10 Å de distancia entre residuos y ligandos)

	L59A	V77A	C79R	L81A	T82A	I90T	S144L	N148S	A184V	W257R	L258V	W261G	E262D
Salicina	65 ^a	85	35	95	95	78	65	80	90	25	35	10	90
11^b/1^c	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
3/1	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
22/1	x	x	x	x	x	x		x		x	x	x	x
11/5	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
22/2	x	x	x	x	x			x		x	x	x	x
Hexil-β-glucósido	7	55	65	60	55	50	55	85	25	18	25	10	88
11/1	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
31/1	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
24/1	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
20/1	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
31/2	x		x	x	x			x		x	x	x	x
4-NP- βmanósido	15	30	80	12	25	20	18	75	10	70	7	85	45
15/1	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
20/1	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
32/1	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
3/1	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
25/1	x	x	x	x	x			x		x	x	x	
β-glucosaminida	45	30	10	15	107	70	15	30	30	30	50	5	25
9/1	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
29/1	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
16/1	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
6/1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
24/1	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

^a % de señal de flujo de calcio en relación al WT, determinada experimentalmente (Thomas, y otros, 2017);

^b número identificativo de la conformación del ligando usada en *docking*; ^c ranking del modelo de *docking*.

En cada celdilla de la tabla, se indican los residuos cuyos centros de masas se encuentran a menos de 10 Å del centro de masas del ligando con una "x".

