



**Facultad de Ingeniería  
Escuela de Ingeniería Civil en Bioinformática**

*Identificación del sitio de unión de  $PIP_2$   
en canales TRP: Descifrando los efectos  
estructurales de la modulación de la  
familia TRP por fosfolípidos.*

**Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Bioinformática**

**Alumno: Luis Gonzalo Espinoza Arcos**

**Prof. Guía: Horacio Poblete Vilches**

**Prof. Informante: Wendy González**

Talca – Chile  
2020

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

## Agradecimientos

Ha sido un largo camino para llegar hasta este lugar y por esto, quiero agradecer a todas las personas que de una u otra forma participaron y contribuyeron en la finalización de este trabajo.

En primer lugar, agradezco a la vida por permitirme ser una persona feliz, correcta e integral. Por las personas que puso en este camino y por las que se fueron de este. Y sin dudas, por darme las herramientas para ser perseverante y resiliente ante todos los desafíos que he enfrentado.

Así también, a todos mis compañer@s del grupo de investigación del cual formé parte durante este proceso. Gracias por la confianza, críticas y retroalimentación constante durante este tiempo. A el profesor, tutor, amigo y líder de equipo, Horacio Poblete, que sin conocerme, depositó toda su confianza en mí. Sin duda, es quien me entregó una gran responsabilidad y me permitió avanzar en este trayecto, dándome la confianza para explorar nuevas habilidades y fortalecer mis debilidades en el área científica; estoy agradecido de la vida por ponerlo en mi camino. *“Doing science”*.

A ti, el amor de mi vida, la mujer más importante de mi vida, compañera y mejor amiga; Arantxa. Sin duda eres tú, y nadie más que tú, quien estuvo a mi lado siempre, en las malas y en las peores, te agradezco por levantarme en los momentos más difíciles de mi vida, y por sobre todo, amarme sin condiciones. Me viste crecer exponencialmente como profesional estos últimos años, y mucho de esto, es gracias a ti. A tus palabras, a tus consejos, a tus abrazos, y a tu compañía incondicional. Este es el primer gran paso, de muchos que daremos juntos. Te amo.

A mis padres, a mis hermanos, Anita, Amalia, Luisa, a la familia Navarrete González, a mi abuela Uberlinda, mi tío Lucho y mi gran tío-amigo Daniel. Este grupo de personas estuvo

siempre. Agradecido de su apoyo incondicional, de preocuparse siempre por mi bienestar y por qué nada me faltase, los amo.

Finalmente, a mis amigos y a todos los que estuvieron siempre. Gracias por preocuparse, por escribir y hacerse presente en todo momento. No tengo palabras ni frases que los definan, siempre los llevo conmigo.

Cada uno de los nombrados en este texto, formaron parte de la iluminación y crecimiento de este ser. Muchas gracias.

*“Y si quieres llegar a algún sitio,  
recuerde siempre sus metas, y nunca  
olvide sus principios”.*

## Abstract

Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) has been recognized as an important modulator of Transient Receptor Potential Receptor (TRP) channels, as well as rectifier channels and signaling proteins. PIP<sub>2</sub> acts as an anchor phospholipid for the recruitment of proteins to the plasma membrane for subsequent activation and cellular signal transduction. TRP channels are one of the most recently discovered members of the ligand-activated ion channel superfamily and current evidence indicates that they are ubiquitously expressed. TRPs can be modulated by endogenous stimuli such as: temperature, pH, mechanical stimuli, endogenous and synthetic ligands, among others. PIP<sub>2</sub> has been shown to be crucial for the recovery from desensitized states of TRPV1 and TRPM8 channels, two of the most studied members of the Thermo-TRP channel subgroup. Detailed knowledge of the function and modulation of TRPs has been a focus of interest for their potential use as a therapeutic target for pain-related diseases. In this work, coarse-grained molecular simulations were used to elucidate possible PIP<sub>2</sub> binding sites in TRP channels. Protein backmapping was performed to study TRPs in atomic models, in which affinity of these channels for positively charged amino acids was found. Additionally, by means of sequence and structure information in literature, the effect of key amino acids (arginines and lysines) in the interaction between PIP<sub>2</sub> and TRPV1, TRP1, TRPM8, TRPC6 and Kir 2.2 channels was analyzed, which by means of sequence alignments allow us to raise new questions for the study of these ion channels.

## Resumen

Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) ha sido reconocido como un importante modulador de canales Receptores de Potencial Transitorio (TRP), como también de canales de rectificación y proteínas de señalización. PIP<sub>2</sub> actúa como fosfolípido de anclaje para el reclutamiento de proteínas a la membrana plasmática para su posterior activación y transducción de señales celulares.

Los canales TRP son uno de los miembros más recientes descubiertos de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando y la evidencia actual indica que están expresados de manera ubicua. Los TRPs pueden ser modulados por estímulos endógenos tales como: temperatura, pH, estímulos mecánicos, ligandos endógenos y sintéticos, entre otros. Se ha demostrado que PIP<sub>2</sub> es crucial para la recuperación desde estados desensibilizados de los canales TRPV1 y TRPM8, dos de los miembros más estudiados del subgrupo de canales Termo-TRP. El conocimiento detallado de la función y modulación de los TRPs ha sido foco de interés por su potencial uso como blanco terapéutico para enfermedades relacionadas al dolor.

En este trabajo se utilizaron simulaciones moleculares de grano grueso para dilucidar posibles sitios de unión de PIP<sub>2</sub> en canales tipo TRP. Se realizó el *backmapping* de las proteínas para estudiar los TRPs en modelos atómicos, en los cuales se encontró afinidad de estos canales por aminoácidos con carga positiva. Adicionalmente, mediante información de secuencia y estructura en literatura, se analizó el efecto de aminoácidos claves (argininas y lisinas) en la interacción entre PIP<sub>2</sub> y los canales TRPV1, TRP1, TRPM8, TRPC6 y Kir 2.2, que mediante alineamientos de secuencias nos permiten plantear nuevas interrogantes para el estudio de estos canales iónicos.

# Índice

<b>Agradecimientos</b>	2
<b>Abstract</b>	4
<b>Resumen</b>	5
<b>Índice</b>	6
<b>1. Introducción</b>	8
Importancia biológica de canales TRP	8
Termo-TRPs y su potencial función biomédica	11
Estructura tridimensional de canales TRP	12
Efecto de PIP2 sobre canales TRP	13
Canales Kir como referencia de modulación estructural por PIP2	14
Modulación de canales TRP mediada por PIP2	16
<b>2. Hipótesis</b>	19
<b>3. Objetivos</b>	19
3.1 Objetivo general:	19
3.2 Objetivos específicos:	19
<b>4. Materiales y Métodos</b>	20
4.1 Generación de modelos de grano grueso de canales de interés	20
4.2 Dinámicas moleculares a gran escala de tiempo de los complejos TRP-PIP2	23
4.3 Caracterización de contactos de PIP2 en canales TRP, para determinación de sitios de unión.	24
4.4 Validación atomística de los sitios de unión identificados para PIP2 en cada canal.	25
4.5. Análisis y alineamiento de secuencias biológicas de canales TRP	26
<b>5. Resultados y Discusión</b>	27

5.1. Ensamblado y modelado de sistemas Coarse-grained para proteínas de membrana de los canales interés junto a PIP2	27
5.2. Ejecución de dinámicas moleculares de grano-grueso	29
5.3. Identificación de sitios de anclaje de PIP2 en canales de interés	30
5.4. Simulación atómica de los complejos canal-PIP2	36
5.5. Análisis de secuencias biológicas de canales TRP	40
<b>6. Conclusión</b>	<b>43</b>
<b>Anexo</b>	<b>45</b>
Material Suplementario, 1. Gráficos de barra de contactos en canales en dinámicas de grano grueso para TRPM8, TRPC6, TRP1, Kir 2.2,	45
Material Suplementario, 2. Sitios de unión predicho en simulaciones de grano grueso para canal TRPV1.	48
Material Suplementario, 3. Gráficos de barra de contactos en canales en dinámicas moleculares atomísticas Kir 2.2, TRPV1, crTRP1, TRPM8 y TRPC6.	49
<b>Bibliografía</b>	<b>53</b>

# 1.Introducción

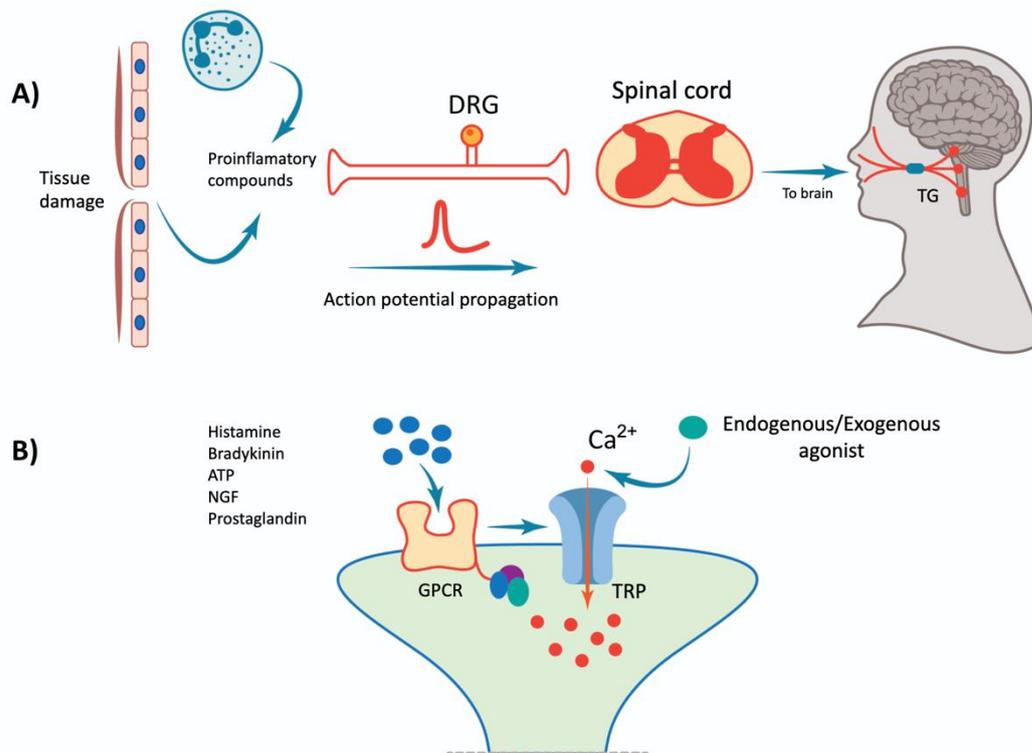
## 1.1 Importancia biológica de canales TRP

El dolor es una percepción negativa, sensitiva, emocional y desagradable que es capaz de limitar capacidades y habilidades, asociándose a un daño tisular. Es una submodalidad de varias sensaciones somáticas que poseen una función protectora al señalar una lesión que debe ser tratada o evitada. Al contrario de otras modalidades sensoriales, tiene una cualidad urgente y primitiva, que es la responsable del aspecto afectivo y emocional de su concientización.<sup>1</sup> El dolor es una respuesta desarrollada por nuestro cuerpo para protegernos del daño, sin embargo, existen numerosas afecciones patológicas, como por ejemplo diabetes, infecciones virales, cáncer, entre otras que producen dolor persistente.

Los terminales nerviosos poseen la capacidad de detectar rápidamente temperaturas en rangos dañinos o en rangos inocuos, con las que se mantiene la homeostasis (regulación de la temperatura) y además, se evita el deterioro de tejidos por exposición a temperaturas dañinas. A nivel molecular estas neuronas poseen en sus terminales nerviosos un conjunto de receptores proteicos, preparados para reconocer y traducir los estímulos nocivos de tipo físico (mecánicos, osmóticos y térmicos) y químicos en señales eléctricas. En este sentido, la mayoría de los organismos vivos disponen de receptores capaces de distinguir un espectro de temperaturas que van desde muy frías ( $\leq 17^{\circ}\text{C}$ ) a muy cálidas ( $\geq 50^{\circ}\text{C}$ ).<sup>2</sup> Las proteínas involucradas en este proceso son las que pertenecen a la superfamilia de receptores de potencial transitorio (TRP), considerándose la familia de canales iónicos más importante que detecta y transmite estímulos nocivos.<sup>3,4</sup> Estas moléculas son capaces de detectar los estímulos nocivos, transformándolos en señales eléctricas y dirigiéndose hacia el Sistema Nervioso Central (SNC) (ver Fig. 1). Como muestra la figura 1.A, es el proceso de estimulación de los nociceptores por lesión tisular. Las señales nociceptivas y compuestos proinflamatorios inician la propagación de un potencial de acción a lo largo de la fibra nociceptiva hacia el Sistema Nervioso Central (SNC) para ser percibido como dolor. La figura 1.B, muestra las señales nociceptivas detectadas por algunos canales iónicos miembros de la familia TRP, los cuales son activados directamente por sus agonistas o mediadores proinflamatorios tales como DRG (*dorsal root ganglion*) o TG (*trigeminal ganglion*), donde en estos, las proteínas

8

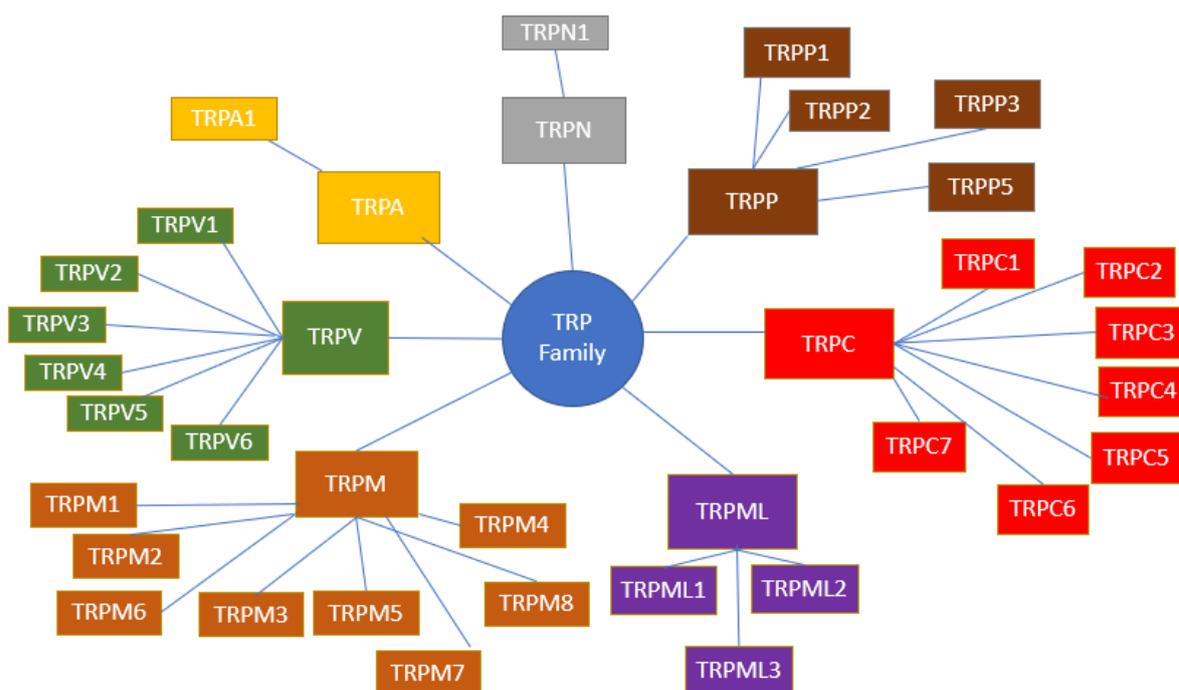
GPCR se encargan de responder a los estímulos que pueden ser ocasionados por compuestos como Histamina, ATP, entre otros.<sup>5</sup>



**Figura 1: Transducción de la señal de dolor.** A) Esquema del proceso de estimulación de los nociceptores por lesión tisular. B) Proceso de captación de señales nociceptivas inducidas por sustancias proinflamatorias.

Los canales TRP son uno de los miembros más recientemente descubiertos de la superfamilia de canales iónicos, los cuales son principalmente activados por ligando.<sup>6</sup> Estos canales están relacionados estructuralmente entre sí, y se expresan en gran cantidad de tejidos desempeñando diversas funciones a través del cuerpo y teniendo como rol fundamental la transducción de señales.<sup>7,8</sup> Además, muchos miembros de la familia TRP son sensores polimodales que cumplen la función de percibir estímulos en células excitables y no-excitables.<sup>9</sup> Por otro lado, basado en la identidad de secuencia es posible agrupar en 7 subfamilias (Figura 2) a los canales TRP en mamíferos: (1) Los TRPC (clásicos) que presentan diferentes modos de activación. (2) Los TRPM (relacionados con melastatina) que presentan un dominio quinasa unido al canal conocido como “chanzymes” (canal-enzima). Estos tipos

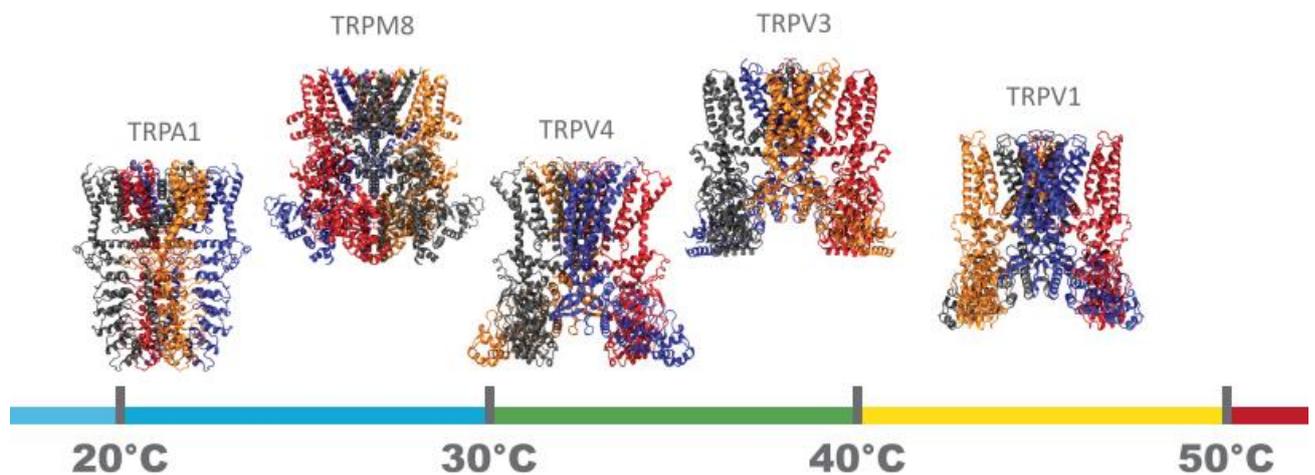
de canales son esenciales en procesos de homeostasis de  $Mg^{+2}$  (TRPM6 y TRPM7)<sup>8,10</sup>. Además, se ha sugerido que algunos miembros de esta subfamilia pueden jugar un rol en la detección de cambios en la temperatura. (3) Los TRPV (vaniloideos), corresponden a una subfamilia que es principalmente activada por cambios de temperatura, y también están implicados en la detección de cambios de osmolaridad y estímulos mecánicos.<sup>11</sup> (4) La subfamilia TRPA (grupo anquirina) contiene un solo miembro (TRPA1), el cual es activado por fríos nocivos y por una gran variedad de compuestos químicos.<sup>12</sup> (5) Los TRPN (NONP-C homólogos) cumplen un importante rol en la mecano-transducción.<sup>13</sup> (6) Los TRPP (policistina) están involucrados en enfermedades renales poliquísticas. Finalmente, (7) los TRPML (mucolipina), es una subfamilia formada por canales que están presentes en la membrana de vesículas intracelulares y están involucrados en procesos de audición.<sup>14</sup> El primer canal identificado de la superfamilia TRP fue TRPV1 y se estudió en el fotorreceptor de *Drosophila*,<sup>15</sup> donde se abre por despolarización retiniana sostenida en presencia continua de luz. Fue descubierto en el año 1997<sup>16</sup> y es reconocido como receptor de capsaicina. Desde entonces, se ha demostrado que desempeña un papel central en los mecanismos del dolor<sup>17</sup> convirtiéndose en el canal TRP de mamíferos más estudiado desde el punto de vista biofísico, de su función celular y regulación.<sup>12,18,19</sup>



**Figura 2: Familia de canales TRP.** Representación esquemática de las subfamilias y canales que la componen.

## 1.2 Termo-TRPs y su potencial función biomédica

Considerando la distribución y funcionalidad de las diferentes subfamilias descritas anteriormente, se distingue un subgrupo de canales conocidos como Termo-TRPs (Fig. 2, TRPM, TRPV, TRPA) que son activados por un calor nocivo hasta un frío doloroso (ver Fig.3). Los Termo-TRPs permiten percibir temperaturas frías o cálidas, actuando como sensores en distintos organismos.<sup>20</sup> Los canales TRPV4 y TRPV3 sensan temperaturas consideradas altas, que van desde los  $>30^{\circ}\text{C}$  a  $<40^{\circ}\text{C}$ ),<sup>21</sup> mientras que TRPV1 y TRPV2 se activan  $<40^{\circ}\text{C}$ .<sup>22,23</sup> Por otro lado, TRPM8 y TRPA1, se activan a temperaturas relativamente bajas ( $<28^{\circ}\text{C}$ ).<sup>24</sup> Adicionalmente, existen otros tres canales TRP (TRPM2, TRPM4 y TRPM5) que también son activados por temperatura, pero no son incluidos dentro del subgrupo Termo-TRP ya que no son expresados en neuronas somatosensoriales primarias.<sup>23</sup>



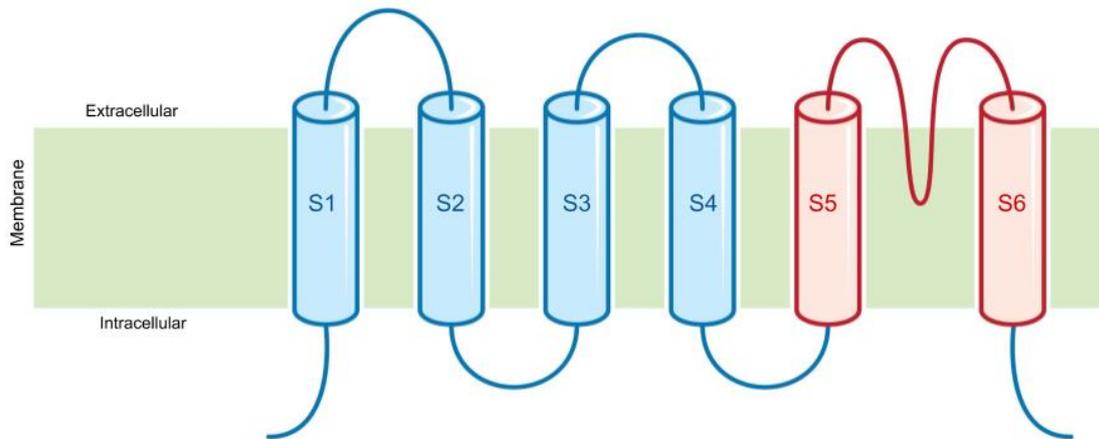
**Figura 3: Diversidad de canales *Termo-TRPs*.** La barra de temperatura muestra el rango de activación de canales termo-TRP. (Arriba izquierda a derecha) Estructura cristalográfica de los canales TRPA1 (PDB: 3J9P), TRPM8(PDB: 6NR4), TRPV4(PDB: 6BBJ) , TRPV3 (PDB: 6MHO) TRPV1(PDB: 6IRZ) y TRPV2 (PDB: 6U84) .

Cabe considerar que los canales del subgrupo *Thermo*-TRPs pueden activarse no sólo por temperatura (Fig.3), si no que también por compuestos endógenos, compuestos naturales derivados de plantas y compuestos sintéticos.<sup>24,25</sup> Por ejemplo, TRPA1, se activa por compuestos picantes de la familia de los isotiocianatos, como aceite de mostaza y alicina de ajo.<sup>26</sup> TRPM8, es activado por químicos que emulan el enfriamiento, como mentol, icilina y eucaliptol.<sup>27</sup> TRPV1 es el único de esta subfamilia que es activado por vanilloides como la capsaicina, una sustancia química picante que se encuentra en el ají.<sup>28</sup> TRPV2 es estimulado por activadores químicos no selectivos como el 2-aminoetoxidifenilborato (2-APB)<sup>29</sup> y cannabidiol.<sup>29,30</sup> Así también, TRPV3 es activado por compuestos como orégano, nuez moscada, canela, albahaca y laurel.<sup>31</sup> Finalmente, TRPV4 es activado por el compuesto *bisandrographolide* de la hierba china *Andrographis paniculata*.<sup>32</sup>

### 1.3 Estructura tridimensional de canales TRP

En general, los canales TRP varían en sus estructuras, esto principalmente por las características propias de cada subfamilia. Es importante conocer las estructuras tridimensionales de estas proteínas y su topología, para lograr entender de las funciones que cumplen, considerando que estos canales poseen similitudes en cuanto a estructura con otros canales iónicos.<sup>33</sup>

Como es sabido, la función general de los canales TRP es regular el flujo de iones a través de la membrana, por lo que poseen una permeabilidad selectiva.<sup>34</sup> Estos canales difieren en cuanto a las características relacionadas con su función; por ejemplo difieren en conductancia, cinética, mecanismos de apertura y cierre, incidencia de los cambios de voltaje de la membrana, entre otros aspectos reguladores.<sup>35</sup> El análisis de canales TRP mediante algoritmos de predicción de segmentos transmembranales (TM) da una idea de la organización que presentan estos canales: 6TM en conformación de alfa-hélice, con los extremos carboxilo y amino terminal en la cara intracelular de la membrana(Figura 4).<sup>36,37</sup> La región del poro está ubicada en los segmentos transmembranales TM5 y TM6.<sup>38</sup>



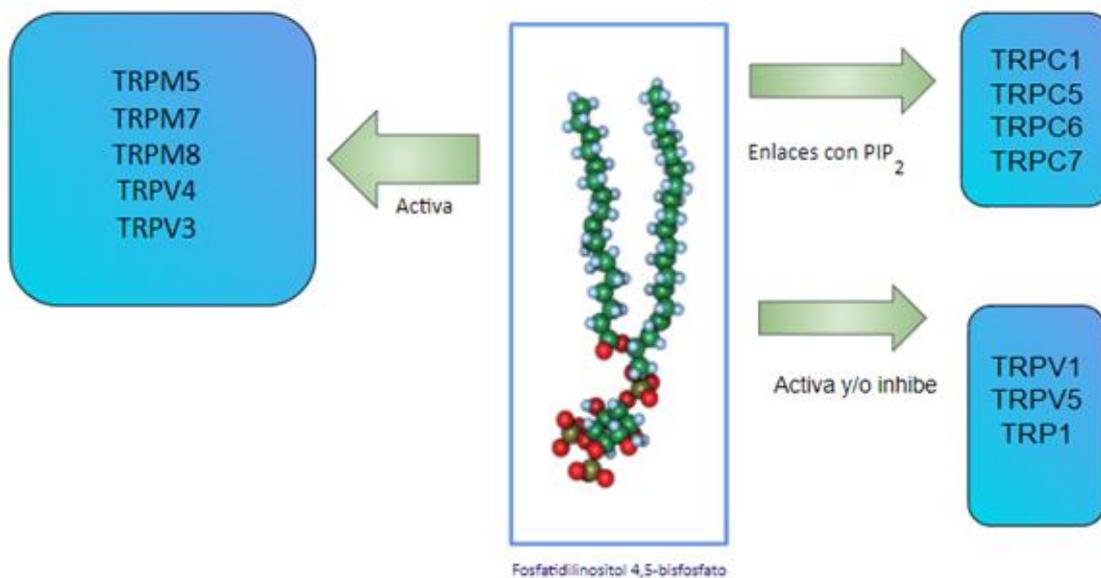
**Figura 4: Topología general de los canales TRP.** Modelo representativo de un monómero de los canales TRP. Segmentos S1 a S4 (azul) representan el dominio sensor de voltaje, Segmentos S5 y S6 (rosado) representan el poro del canal. El *loop* transmembranal que une los segmentos S5 y S6 conforma el filtro de selectividad del canal. La membrana está representada detrás de los segmentos transmembranales.

En base a su topología de segmentos TMs, los canales TRP se han relacionado y comparado estructuralmente con la superfamilia de canales catiónicos activados por voltaje. Estudios bioquímicos y ópticos postulan que los canales TRP están formados por cuatro subunidades las cuales pueden estar distribuidas como homo o heterotetrámeros.<sup>3,39</sup> Al estar ubicados en la membrana celular (bicapa lipídica), su actividad está regulada por las propiedades fisicoquímicas de la bicapa.<sup>97</sup> Existe una gran cantidad de compuestos exógenos de naturaleza lipídica que actúan como moduladores de la actividad de los canales TRP y por esto, ha existido un gran interés en la última década en investigar el rol que cumplen los lípidos en la modulación de canales TRP, para así generar nuevos moduladores con fines terapéutico.<sup>40</sup> Específicamente, el fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) ha mostrado ser crucial en la modulación de una gran cantidad de miembros de la superfamilia TRP, cumpliendo el rol de activar, inhibir, desensibilizar o regular cambios estructurales según sea el canal TRP al cual se produzca la unión.<sup>41,42</sup>

#### 1.4 Efecto de PIP<sub>2</sub> sobre canales TRP

El fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) conforma el 1% de todas las membranas celulares.<sup>43</sup> Todos los canales Termo-TRPs conocidos hasta la fecha están sujetos a la regulación por este ligando o al menos poseen algún tipo de interacción con PIP<sub>2</sub>.<sup>44</sup> Como muestra la Figura 5, la acción de PIP<sub>2</sub> en canales como TRPM5, TRPM7, TRPM8 y TRP4 es de

activación, mientras que el efecto de PIP<sub>2</sub> en TRPV1 y TRPA1 sigue siendo ampliamente debatido, aunque el lípido parece estar involucrado en la activación del canal.<sup>28,45</sup> TRPM3 también actúa como receptor de PIP<sub>2</sub> pero no se ha descrito si este influye en la actividad del canal.<sup>46</sup> Es importante considerar que PIP<sub>2</sub> puede actuar como cofactor, no sólo en canales de la familia TRP si no que también en canales de la familia Kir<sup>51</sup> (Fig. 5). Teniendo en cuenta toda la información asociada a la unión de PIP<sub>2</sub> a canales de la familia TRP y el desconocimiento de ciertos aspectos de esta unión, se hace necesario entender los cambios evolutivos que han permitido que esta “afinidad” se mantenga en el tiempo.<sup>47</sup>



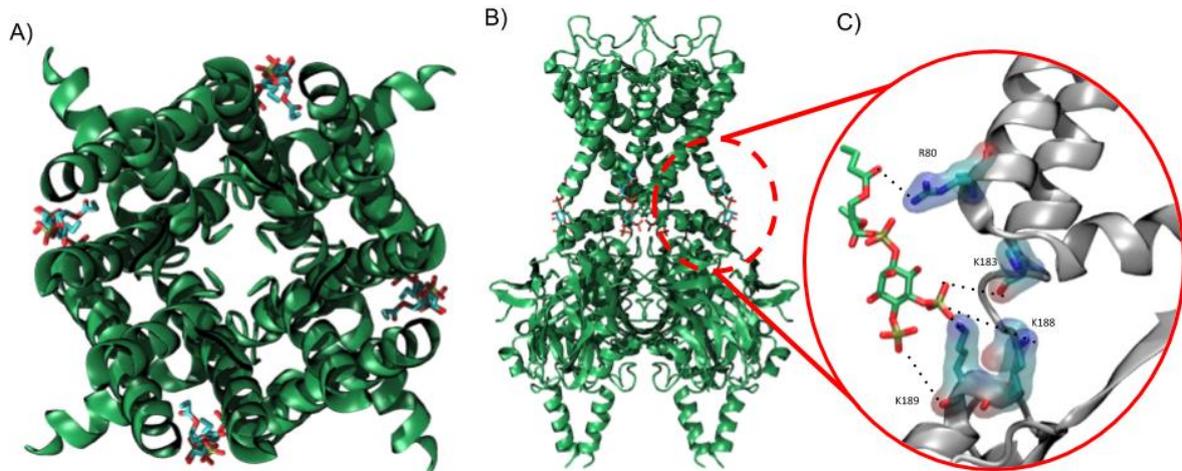
**Figura 5: Efectos de PIP<sub>2</sub> sobre canales iónicos.** PIP<sub>2</sub> activa canales de la familia Kir y miembros de la familia TRPM, agregando a TRP4 (recuadro izquierdo, “Activa”). Por otro lado, PIP<sub>2</sub> se une a canales como TRPC1, TRPC5, TRPC6 y TRPC7 (recuadro esquina superior derecha, “Enlaces con PIP<sub>2</sub>”). Finalmente, se discute si PIP<sub>2</sub> participa en la activación o inhibición de canales como TRPV1, TRP1 y TRPV5 (recuadro esquina inferior derecha, “Activa y/o inhibe”).

### 1.5 Canales Kir como referencia de modulación estructural por PIP<sub>2</sub>

En la actualidad, el mayor conocimiento estructural del efecto de la unión de PIP<sub>2</sub> en canales iónicos se asocia a la familia de canales rectificadores de entrada de potasio (Kir).<sup>48(p2)</sup> Los canales Kir son tetrámeros compuestos únicamente por un dominio de poro (homólogos en

estructura a los segmentos S5 y S6 en canales TRP), sin poseer un dominio sensor de voltaje como otros canales catiónicos. Hasta la fecha, múltiples estructuras cristalográficas de canales Kir han sido depositadas en la base de datos PDB, en muchos casos co-cristalizadas con el fosfolípido PIP<sub>2</sub>.<sup>49,50,51</sup> En el reporte de la estructura cristalizada del complejo Kir2.2-PIP<sub>2</sub>,<sup>48(p2)</sup> se ha descrito que este fosfolípido regula la actividad del canal iónico uniéndose a los dominios transmembrana y citoplasmáticos. En el sitio de unión, PIP<sub>2</sub> forma enlaces con aminoácidos de estas dos regiones estructurales que conforman el canal (ver Fig. 6). Las cadenas de acilo, *backbone* del glicerol y cabezas primer fosfato interactúan con el dominio transmembrana, mientras que el dominio citoplasmático interactúa con el grupo principal de inositol de PIP<sub>2</sub>.<sup>51</sup>

La regulación de los canales de tipo Kir, se lleva a cabo por un cambio conformacional que permite que la proteína varíe entre dos conformaciones alternativas también conocido como *gating*,<sup>52</sup> proceso que abre y cierra el canal. Un dominio citosólico altamente conservado en las subfamilias de proteínas Kir conforma un vestíbulo que junto con el poro transmembranal genera un largo poro de conducción de iones.<sup>53</sup> Estudios biofísicos y datos de mutagénesis han sugerido que el sitio de unión de PIP<sub>2</sub> en canales Kir está compuesto por residuos con carga positiva (Lisinas y Argininas).<sup>42</sup> Basta información se encuentra disponible para distintos miembros de la familia Kir respecto a la descripción estructural y funcional de la unión de PIP<sub>2</sub>, por lo cual Kir es un punto de referencia crucial para este trabajo de tesis al momento de comparar la unión de este fosfolípido con miembros de la familia TRP.



**Figura 6: Estructura cristalográfica del complejo Kir2.2 junto a PIP<sub>2</sub> (PDB: 3SPH).** (A) Vista superior del poro y cuatro moléculas de PIP<sub>2</sub> en los vestíbulos de anclaje del canal Kir2.2. (B) Vista lateral del complejo Kir2.2-PIP<sub>2</sub>. (C) Vestíbulo de unión de PIP<sub>2</sub> a Kir 2.1 donde forma enlaces con R80, K183, K188 y K189.

### 1.6 Modulación de canales TRP mediada por PIP<sub>2</sub>

El sitio de unión de PIP<sub>2</sub> en el canal TRPV1 ha sido descrito a través de técnicas electrofisiológicas, modelado molecular y mutagénesis, así como también el efecto de activación que genera el fosfolípido sobre TRPV1.<sup>28</sup> Este sitio, ubicado en la denominada *TRP-Box* y el *linker S4-S5*, mostró una fuerte disminución en la capacidad de unir PIP<sub>2</sub> en las mutantes K571A, R575A, R579A y K694A.<sup>54</sup> Este vestíbulo de unión mostró concordancia con la estructura cristalográfica obtenida por el grupo de Julius, pero atribuyendo la función inhibitoria de capsaicina TRPV1.<sup>65</sup> Sin embargo, múltiples artículos demuestran el efecto de activación generado por PIP<sub>2</sub>, como además descripciones estructurales detalladas de la razón de competencia por el sustrato natural capsaicina.<sup>45,51</sup> El mismo tipo y número de aminoácidos básicos han sido descritos como sitio de unión de PIP<sub>2</sub> en TRPV1 y Kir. Estos han sido dilucidados a través de trabajos de dinámica molecular de grano grueso de PIP<sub>2</sub> (R50, R54, K67, R176, R206) con Kir6.2 y Kir2.2,<sup>55,48</sup> mediando su activación. El agotamiento por depleción de PIP<sub>2</sub> inhibe las corrientes para canales como TRPM7, TRPM5, TRPM8 y TRPM4.<sup>56</sup> Por otra parte, en el caso de TRPM8, algunos residuos cargados positivamente tales como

K995, R999 y R1008 son parte de un dominio conservado en el extremo C-terminal de los canales TRP, los cuales son determinantes para la activación de este canal, y están involucrados en la activación de TRPM8 por PIP<sub>2</sub>.<sup>57</sup> También, se debe considerar el rol de este fosfolípido en la desensibilización dependiente de Ca<sup>2+</sup> en este canal.<sup>8</sup> TRPV4 es activado por estímulos hipotónicos y de calor, pero se demostró que a la unión de PIP<sub>2</sub> neutraliza las cargas positivas de los aminoácidos K121, R122, W123, R124 y K125, en consecuencia el canal no responde a efectos de hipotonicidad y calor, inhibiéndose la actividad del canal.<sup>58</sup> Canales como TRPV5 y TRPV6 son activados por PIP<sub>2</sub> lo que conduce a la estabilización del canal en un estado abierto.<sup>59</sup>

El canal TRP1 del alga *Chlamydomonas reinhardtii* (crTRP1), fue heredado de un ancestro común de plantas y animales considerándose este como un precursor de los canales TRP. Hay evidencia que varios organismos unicelulares dentro de los géneros *Dictyostelium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Plasmodium* codifican para canales de esta superfamilia. Mediante técnicas de microscopía crioelectrónica (cryoEM), se logró observar que el canal crTRP1 es activado por la unión de PIP<sub>2</sub> en sitios formados por la parte terminal de S4-S5, el linker de S2-S2 y las hélices que forman a S5 y S6, siendo estas últimas subunidades donde se puede acomodar el grupo de la cabeza de PIP<sub>2</sub> cargado negativamente.<sup>61</sup> En base a esto, McGoldrick plantea que crTRP1 se heredó de un ancestro en común de plantas y animales, por la interacción que mantiene este canal con PIP<sub>2</sub> que puede estar conservada en otros miembros de la familia TRP.<sup>62,63</sup>

Considerando toda la evidencia mostrada, hay interrogantes que aún no se han abordado, como: ¿existe un dominio común de unión de PIP<sub>2</sub> en diversos miembros de la familia TRP? ¿es posible identificar nuevos canales como miembros de la familia TRP según su capacidad de unir PIP<sub>2</sub>? ¿Se ha conservado el sitio de unión a PIP<sub>2</sub> desde los miembros más primitivos de la familia TRP? Estas, y otras interrogantes se estudiarán en esta memoria mediante la aplicación de metodologías de simulación molecular de grano grueso y dinámicas moleculares clásicas, considerando tiempos de simulación a gran escala. Se analizarán las secuencias de la familia TRP, para comprender tanto con factores estructurales como de secuencia, qué ocurre en la interacción de PIP<sub>2</sub> con los canales Kir 2.2, TRPV1, TRPM8, TRPC6

y TRP1. Esta información podría ayudar en la determinación de nuevos miembros de la familia TRP en base a esos criterios.

## 2. Hipótesis

Considerando la información estructural y los datos reportados asociados a la modulación y regulación de canales de la familia TRP por Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato se plantea que: “existe un dominio conservado dentro de la familia TRP que permite la unión y modulación de la actividad del canal a través del anclaje de PIP<sub>2</sub>, el cual permitirá predecir nuevos miembros de la familia modulados por este lípido”.

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general:

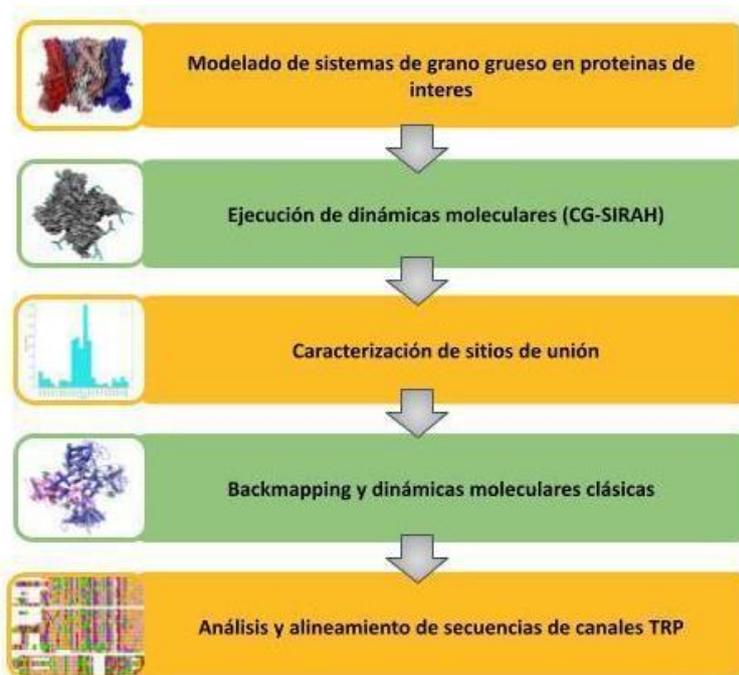
Identificar un sitio de unión común de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) en canales de la familia TRP, basado en la información de canales conocidos como: TRPV1, TRPM8, TRPC6, TRP1, Kir 2.2, prediciendo así potenciales sitios de unión de PIP<sub>2</sub> en otros canales de la familia TRP.

### 3.2 Objetivos específicos:

1. Generar modelos de grano grueso de los canales TRPV1, TRPM8, TRPC6, TRP1 y Kir 2.2.
2. Realizar dinámicas moleculares (CG-SIRAH) a gran escala de tiempo de los complejos TRP-PIP<sub>2</sub>
3. Caracterizar contactos de PIP<sub>2</sub> en canales TRP, para determinación de sitios de unión.
4. Validar a nivel atómico los sitios de unión identificados para PIP<sub>2</sub> en cada canal a través de simulación molecular clásica.
5. Análisis y alineamiento de secuencias biológicas de canales TRP.

## 4. Materiales y Métodos

Para lograr los objetivos planteados en esta Memoria de Título, se utilizaron metodologías de dinámica molecular clásica y de grano grueso, ambas con solvente explícito, lo cual en conjunto permitió generar conocimiento de los parámetros estructurales que controlan la unión de PIP<sub>2</sub> en canales de la familia TRP. El siguiente diagrama, explica los cinco pasos de esta metodología que se siguieron para alcanzar los objetivos del trabajo:



**Diagrama 1:** Esquema de pasos consecutivos de la metodología.

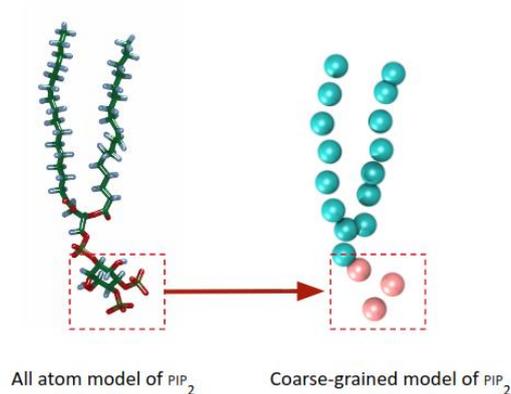
### 4.1 Generación de modelos de grano grueso de canales de interés

En una primera etapa, para estudiar los detalles estructurales de la interacción del fosfolípido PIP<sub>2</sub> y canales miembros de la superfamilia TRP, se seleccionaron canales que poseen un sitio de unión de PIP<sub>2</sub> validados por técnicas experimentales (cristalografía), como también miembros en que haya sido reportada la modulación por PIP<sub>2</sub> (activación o inhibición). Así, para el desarrollo de este trabajo, inicialmente se utilizaron las estructuras cristalográficas de los siguientes canales: TRPV1, TRPM8, TRP1, TRPC6, junto al canal Kir 2.2, ya que este último, posee una gran cantidad de literatura existente respecto a la unión y

modulación por causa de PIP<sub>2</sub>.<sup>48</sup> Los códigos de acceso en la base de datos *Protein Data Bank*<sup>64</sup> son 5IRZ para TRPV1,<sup>65</sup> 6BPQ para TRPM8 ,<sup>66</sup> 6PW5 para crTRP1,<sup>61</sup> 6UZ8 para TRPC6 y 3SPG para Kir2.2.<sup>67(p6),48(p2)</sup> Todas estas estructuras, además, se encuentran disponibles en la base de datos *Orientation of Protein Membranes (OPM)*,<sup>68</sup> la cual entrega información sobre la orientación del canal en relación a la membrana lipídica, esto facilitando la preparación de los sistemas previo a ser sometidos a dinámica molecular.

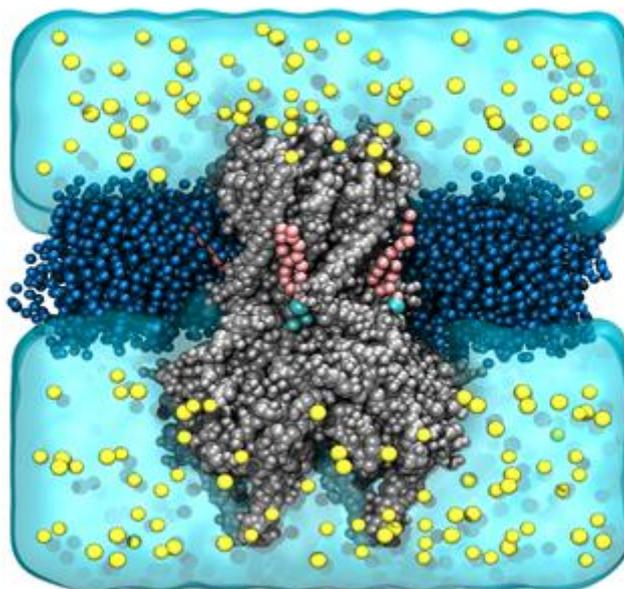
Las estructuras cristalográficas de los canales mencionados en el párrafo anterior, fueron procesadas en el servidor *PDB2PQR* con el fin de evaluar los estados de protonación de los aminoácidos protonables (Asp, His y Glu) según el pH fisiológico, así como también el microentorno de cada aminoácido en la proteína.<sup>69</sup> Luego, cada canal se embebió en un parche de membrana tipo POPC,<sup>70</sup> considerando 25Å de margen desde el canal al límite de la caja periódica, además tanto el canal como la membrana de POPC se orientaron respecto a las coordenadas espaciales entregadas por OPM. Posteriormente, se adicionaron de forma aleatoria 8 moléculas de PIP<sub>2</sub> embebidas en la membrana lipídica de POPC, alrededor de cada canal (en el plano xy perpendicular al plano de la membrana), utilizando la herramienta PackMol.<sup>71</sup> Por otro lado, el canal Kir2.2 fue sometido a los mismos protocolos antes mencionados, luego de retirar las moléculas de PIP<sub>2</sub> co-cristalizadas en la estructura extraída de PDB. Cabe considerar que a lo largo de este proyecto el canal Kir 2.2 fue utilizado como control, al existir una estructura cristalográfica con PIP<sub>2</sub> unida a los ya validados sitios de unión, para así ajustar los protocolos de simulación para los miembros de la familia TRP antes mencionados.

Para estudiar la difusión espontánea de PIP<sub>2</sub> a los potenciales sitios de unión en canales de la familia TRP, se construyeron modelos del tipo grano grueso (*coarse-grained*) de PIP<sub>2</sub> (Fig. 7) y de todo el sistema intentando imitar condiciones fisiológicas, como prueba de concepto se utilizó el canal Kir 2.2 co-cristalizado con PIP<sub>2</sub> para validar esta etapa de la metodología (Fig. 8).<sup>72</sup> Se transformaron los sistemas atomísticos previamente construidos a modelos *coarse-grained* utilizando la herramienta SIRAH Tools que utiliza los parámetros del campo de fuerza SIRAH 2.0.<sup>73,74</sup>



**Figura 7: Tipos de representación de PIP<sub>2</sub>.** Representación atómica de la molécula PIP<sub>2</sub> y su transformación con SIRAH Tools a modelo de grano grueso.

Con la finalidad de evitar la superposición de átomos, se removieron todos los lípidos a una distancia de corte de 3.5 Å con el canal y a una distancia de 2 Å respecto a PIP<sub>2</sub>, utilizando el software VMD.<sup>75</sup> Posteriormente, el sistema fue solvatado con moléculas de agua tipo WT4-Sirah y se adicionaron iones solvatados NaW<sup>+</sup> y ClW<sup>-</sup> (según el campo de fuerza SIRAH), con el fin de mantener la neutralidad de carga del sistema. Cabe considerar que las esferas que representan iones poseen el volumen de un ión solvatado con 4 moléculas de agua atómicas a su alrededor. La estimación de la cantidad de iones que se incluyeron en el sistema *coarse-grained* se consigue en base a el protocolo publicado recientemente por los desarrolladores de SIRAH.<sup>76</sup> Finalmente, el archivo de coordenadas resultante (Fig. 8) se convierte mediante la herramienta *pdb2gmx* al formato compatible con el software GROMACS,<sup>77</sup> para posteriormente proceder a ejecutar la dinámica molecular con el motor de simulación GROMACS 2018.2.



**Figura 8: Representación coarse-grained del complejo Kir 2.2 co-cristalizado con PIP<sub>2</sub>.** Representación del canal completo (plata), de los iones (amarillo), del parche de membrana tipo POPC (azul), el agua como superficie (celeste) y las moléculas PIP<sub>2</sub> coloreadas según tipos de átomos como carbonos (rosado) y fosfatos (cyan).

#### 4.2 Dinámicas moleculares a gran escala de tiempo de los complejos TRP-PIP<sub>2</sub>

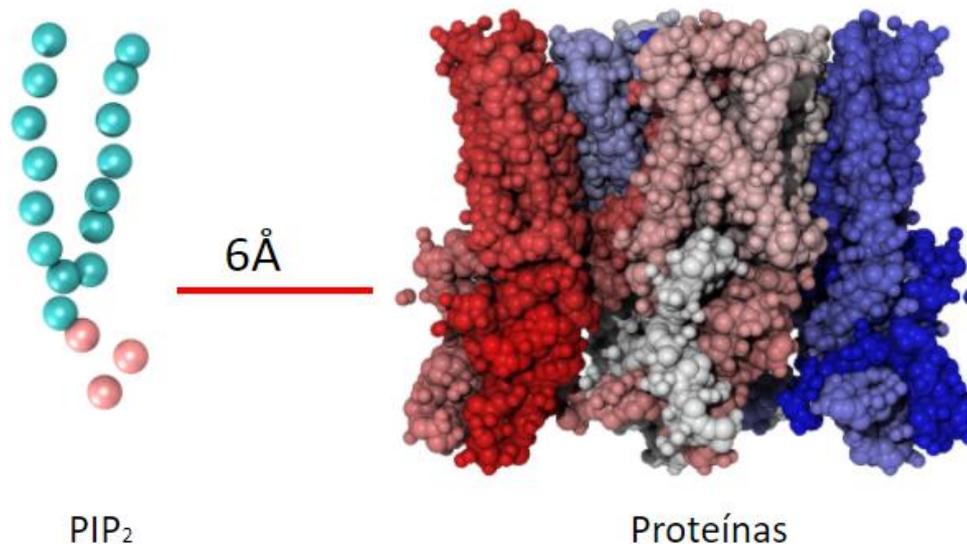
Con el objetivo de solucionar errores conformacionales iniciales, tales como: superposición de aminoácidos, mala orientación de cadenas laterales y péptidos, como también ángulos mal definidos, se realizaron dos etapas de minimización estructural, aplicando restricciones posicionales a distintos grupos del sistema. En detalle, en una primera etapa, se realizó una minimización por 20.000 pasos de simulación aplicando una restricción de posición sobre el *backbone* como también en las cadenas laterales del canal. En esta etapa de minimización se busca que tanto la membrana lipídica como el solvente eliminen aberraciones generadas en el *ensamble* inicial del sistema. Posteriormente, en una segunda etapa de minimización de 20.000 pasos se eliminaron todas restricciones en el complejo, buscando un mínimo energético conformacional de todo el sistema molecular. Las minimizaciones son desarrolladas siguiendo protocolos previamente definidos en el grupo de desarrollo de SIRAH Force Field.<sup>78</sup>

La búsqueda de una conformación de equilibrio para los complejos canal-PIP<sub>2</sub>, se realizó, al igual que la minimización, en dos etapas aplicando restricciones de forma escalonada. Así, en la primera etapa, se aplicaron restricciones en el *backbone* de la proteína y moléculas de PIP<sub>2</sub> por un período de simulación de 50 nanosegundos, para facilitar el desplazamiento de lípidos a zonas donde se hayan eliminado moléculas POPC en la preparación del sistema. La segunda etapa de equilibrado del sistema se realizó sin restricciones durante 50 nanosegundos de simulación, asegurando así que el sistema completo alcance un estado de equilibrio termodinámico. Finalmente, para cada uno de los sistemas generados (15 sistemas totales) se realizaron simulaciones de producción de datos con un tiempo total de 1  $\mu$ s. Se realizaron 2 réplicas de cada sistema (totalizando 3 cálculos por cada complejo) para así asegurar un correcto muestreo conformacional del sistema molecular. Las simulaciones de dinámica molecular fueron ejecutadas en el software GROMACS 2018.2 utilizando la versión compilada para uso de tarjeta GPU.<sup>79</sup>

#### **4.3 Caracterización de contactos de PIP<sub>2</sub> en canales TRP, para determinación de sitios de unión.**

Con la finalidad de cuantificar las interacciones de PIP<sub>2</sub> con cada canal durante la trayectoria de la dinámica molecular, y así determinar/corroborar un sitio de unión putativo para cada canal TRP en estudio, se diseñó un script en el lenguaje de programación *Tcl/Tk* compatible con el software de visualización VMD,<sup>80</sup> el cual utiliza como entrada la trayectoria final de producción. De esta forma, se considerará como un contacto cada vez que una molécula de PIP<sub>2</sub> ingrese en un radio de 6Å de cualquier aminoácido del canal.<sup>81</sup> Más en detalle, se calcularon contactos en cada paso de simulación, midiendo la distancia desde el centro de masa de las cabezas polares de PIP<sub>2</sub> al centro de masa de los residuos de la proteína que estén dentro de esta zona de interés (Figura 9). Los resultados de caracterización de contactos obtenidos para cada una de las réplicas son graficados con la librería Matplotlib de Python,<sup>82,83</sup> obteniéndose valores de frecuencia que determinarán las zonas de alta y baja densidad de contactos de PIP<sub>2</sub>. Finalmente, un “sitio de unión” putativo se reconoce como una zona de alta frecuencia de contactos. Se puso especial énfasis en este análisis en las zonas de la proteína que contengan aminoácidos con carga positiva (Argininas y/o Lisinas), así como

también en la disposición estructural de “*pockets*” de aminoácidos que interactúan a la distancia de corte mencionada en el punto 3. De esta forma, se identificaron zonas de mayor frecuencia de contactos de PIP<sub>2</sub>, definiéndose así, como posibles sitios de unión.<sup>94</sup>



**Figura 9: Modelo coarse-grained de TRPV1 y PIP<sub>2</sub>:** Distancia entre las cabezas polares de moléculas de PIP<sub>2</sub> (en rosado) y los aminoácidos que estén dentro de un radio de 6 Å. Este cálculo se realizará entre los centros de masa de la cabeza del lípido y del aminoácido.

#### 4.4 Validación atómica de los sitios de unión identificados para PIP<sub>2</sub> en cada canal.

Para validar la estabilidad y conservación en el tiempo de cada sitio de unión, se generaron modelos atómicos de las proteínas a partir de las conformaciones de equilibrio de las simulaciones obtenidas con la metodología *coarse-grained*. Tomando como punto de partida la última posición de la proteína de cada simulación *coarse-grained*, se realizó la “reconstrucción atómica más probable” (*backmapping*) a través del plugin de SIRAH Tools “*sirah\_backmap*” implementado en el software VMD, el cual utiliza las herramientas AmberTools para predecir la orientación atómica más probable.<sup>84</sup> Por otra parte, para mantener la conformación estructural de cada PIP<sub>2</sub> durante la dinámica molecular, se realizó un superposicionamiento de los grupos fosfatos de PIP<sub>2</sub> tanto de las estructuras de grano

grueso y atomísticas con el software ChimeraX.<sup>85</sup> Para esto sólo se consideraron las moléculas de PIP<sub>2</sub> que se encontrarán a una distancia de 3Å de la proteína. Luego estas estructuras canal-PIP<sub>2</sub> fueron ensambladas, embebidas en una membrana lipídica y solvatadas, siguiendo los protocolos clásicos para realizar una dinámica molecular atomística.<sup>78</sup> Así, se realizaron 10.000 pasos consecutivos de minimización y 7 ns de equilibrado conformacional con el software NAMD,<sup>87</sup> bajo el campo de fuerza CHARMM36,<sup>86</sup> estudiando así la estabilidad conformacional de los sitios predichos por la metodología *coarse-grained*. Finalmente, la producción de dinámica molecular para cada cálculo fue de 50ns. Las trayectorias obtenidas también fueron sometidas a la caracterización de contactos descrita anteriormente con las dinámicas de grano grueso.

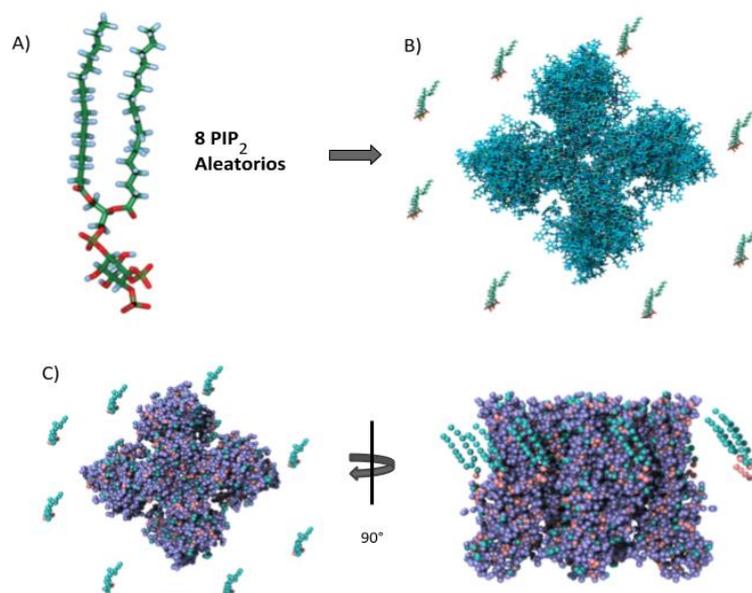
#### 4.5. Análisis y alineamiento de secuencias biológicas de canales TRP

Con la finalidad de identificar un dominio común para la unión de PIP<sub>2</sub> a canales de la familia TRP, se realizó un alineamiento de secuencia aminoacídica para toda la familia de canales TRP. En base a los códigos de acceso PDB de los canales de interés (sección 4.1), se descargaron las correspondientes secuencias de proteínas desde el servidor *Protein Data Bank*, y además se añadieron las secuencias de canales de las familias TRP descritas en la Figura 2. Inicialmente, se obtuvieron los largos de las secuencias, con el módulo “*Bio::Seq*” de *BioPerl*.<sup>88</sup> Una vez evaluado el conjunto de secuencias, y con la finalidad de identificar dominios característicos a nivel de toda la familia TRP, se realizó un alineamiento múltiple con el software Clustal Omega.<sup>89</sup> El alineamiento múltiple fue procesado con la herramienta BioPerl y visualizado con el software Jalview.<sup>90,91</sup> Integrando la información obtenida en la sección 4.3 y 4.4, se evaluó una potencial relación entre los aminoácidos identificados como importantes en la unión de PIP<sub>2</sub> desde las simulaciones moleculares y aquellos que muestran una conservación a nivel de secuencia. De este modo se propuso una metodología para caracterizar dominios aminoacídicos que describen sitios de unión de PIP<sub>2</sub> en distintos miembros de la familia TRP.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Ensamblado y modelado de sistemas *coarse-grained* de los canales de interés junto a PIP<sub>2</sub>

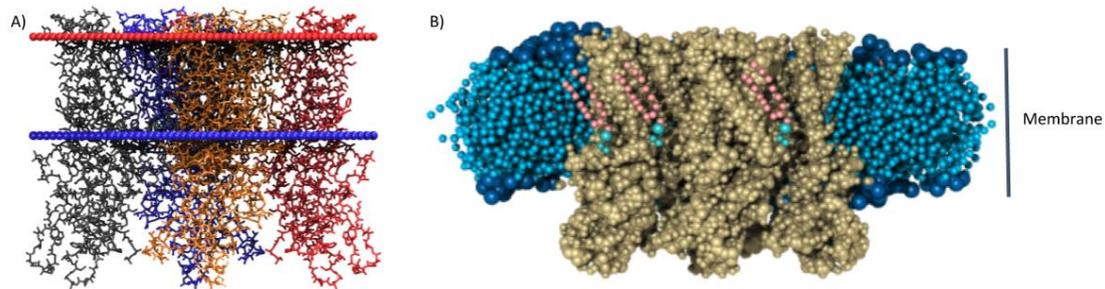
Para evaluar la potencial carga neta de cada sistema, se calcularon los estados de protonación de los aminoácidos que componen las proteínas de interés, para esto se utilizó el servidor web PDB2PQR, donde se corrigieron principalmente aminoácidos como lisina, arginina e histidina.<sup>69</sup> Se incluyeron en este análisis los canales iónicos TRP1(PDB ID: 6PW5), TRPV1(PDB ID:5IRZ), TRPM8(PDB ID: 6PBQ), TRPC6(PDB ID: 6UZ8) y Kir2.2 (PDB ID: 5KUM), extraídos desde la base de datos *Protein Data Bank*.<sup>64</sup> Se utilizó el software PackMol para añadir 8 moléculas de PIP<sub>2</sub> de manera aleatoria alrededor de los canales. Con la finalidad de convertir los sistemas atómicos a una estructura del tipo grano grueso, se utilizó el *plug-in* SIRAH-Tools para realizar el “mapeo” de las estructuras previamente generadas.<sup>73</sup> Así también se generaron topologías correspondientes al campo de fuerza SIRAH (ver Figura 10).



**Figura 10: Conversión de estructuras atómicas a grano grueso:** A) Representación atómica de molécula de PIP<sub>2</sub>. B) Disposición espacial de las ocho moléculas de PIP<sub>2</sub> alrededor del canal TRPV1 (PDB ID: 5IRZ). C) Modelado de grano grueso de TRPV1 con las moléculas de PIP<sub>2</sub>.

El protocolo de ensamble y modelado de grano grueso se repitió para todos los canales seleccionados. La figura 10 muestra una imagen representativa del ensamble del

canal TRPV1, a modo de ejemplo de todos los complejos canales-PIP<sub>2</sub>. En la figura 11 se observa el canal ya embebido en un parche de membrana de grano grueso de moléculas POPC, el cual fue previamente equilibrado y además alineado según la orientación sugerida por el servidor OPM.<sup>68</sup>



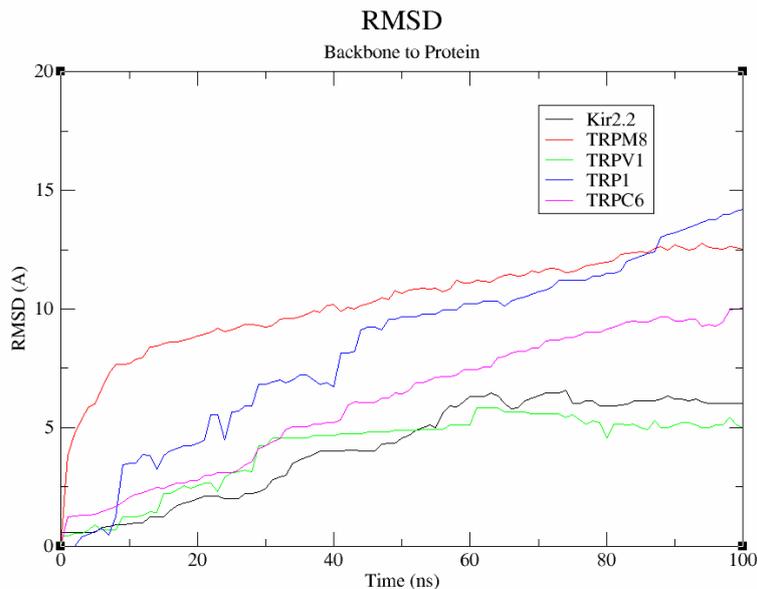
**Figura 11: Ensemble de canales en la membrana de tipo POPC:** A) Las esferas azules y rojas muestran la altura del parche y la ubicación en el plano tridimensional en relación con el canal TRPV1 (PDB ID: 5IRZ). B) Ensemble del parche de tipo POPC preequilibrado (azul) de grano grueso en conjunto con el canal TRPV1 (amarillo), con las moléculas de PIP<sub>2</sub> (cadenas acílicas en rosado y grupo fosfato en celeste).

Con el objetivo de facilitar el análisis de las trayectorias de dinámica molecular, los sistemas fueron centrados en el origen de las coordenadas tridimensionales, para posteriormente ser solvatados con moléculas de agua de tipo WT4-Sirah, formando así una caja periódica de 180x180x180 Å para el canal TRPV1, Cabe considerar que el tamaño es distinto para cada canal estudiado, considerando las dimensiones espaciales de cada canal. Estos sistemas fueron ionizados con moléculas solvatadas NaW<sup>+</sup> y ClW<sup>-</sup> (según el campo de fuerzas SirahFF), para así asegurar la neutralidad de carga del sistema. La estimación de la cantidad de iones a incluir en el sistema *coarse-grained* está basado en el protocolo publicado por los autores del campo de fuerza SIRAH y esta cantidad depende de las cargas intrínsecas de cada canal.<sup>74</sup> Las estructuras finales del ensemble proteína-PIP<sub>2</sub>-membrana-agua (Fig. 11) se convirtieron mediante la herramienta *pdb2gmx* al formato compatible con el *software* GROMACS.<sup>77</sup> El protocolo propuesto se repitió para todos los canales mencionados anteriormente, y las dinámicas fueron ejecutadas en el motor de dinámicas moleculares GROMACS 2018.2 para GPU.<sup>79</sup>

## 5.2. Ejecución de dinámicas moleculares de grano-grueso

Con el objetivo de estudiar la difusión e interacción entre el fosfolípido PIP<sub>2</sub> y diferentes miembros de la familia TRP, se realizaron simulaciones moleculares bajo el esquema *coarse-grained*. Se construyeron modelos de grano grueso para los cinco canales de interés, por medio de los parámetros incluidos en el campo de fuerza SIRAH. La elección de este modelo tiene directa relación con la cantidad de átomos involucrados en los sistemas a simular, el tiempo de difusión necesario para observar contactos y evitarse el costo computacional que conlleva utilizar metodologías que incluyen todos los átomos. Por lo anterior, la simulación molecular de tipo grano grueso permite alcanzar tiempos de dinámica molecular en el orden de los microsegundos con un menor costo computacional, mediante la representación de los sistemas con un número reducido de átomos y grados de libertad. Sin embargo, es evidente la pérdida del detalle atómico en las simulaciones obtenidas.

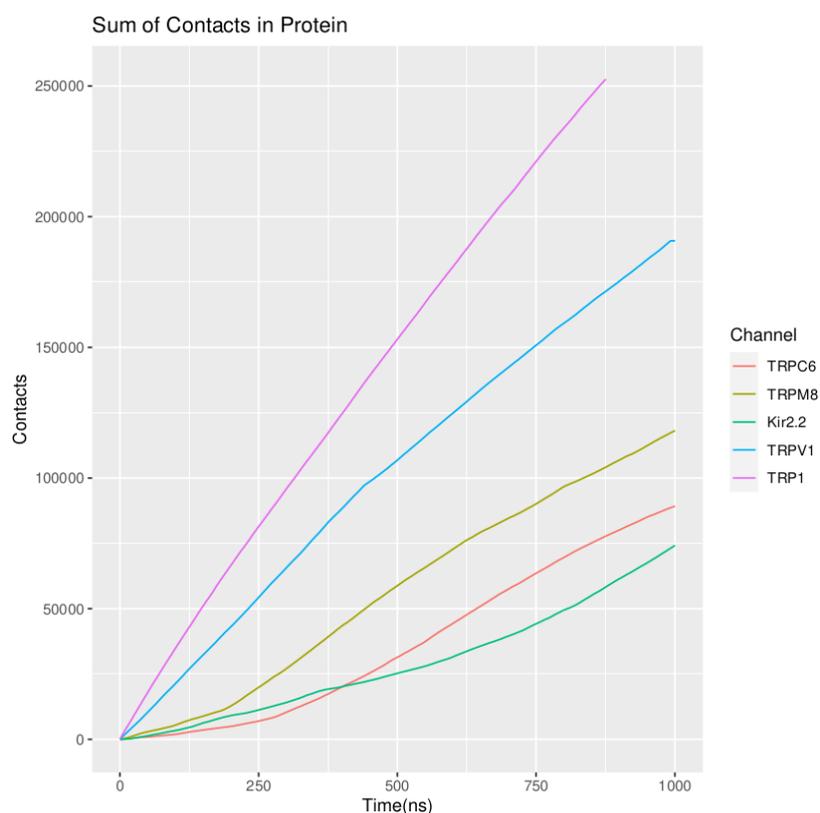
Para todos los sistemas construidos anteriormente, se realizaron 3 dinámicas moleculares por sistema considerando en cada caso 8 moléculas de PIP<sub>2</sub> ubicadas de manera aleatoria dentro de la membrana lipídica. En una primera instancia, se realizó una minimización energética de 20.000 pasos sobre el *backbone* de la proteína, seguida de una segunda minimización energética de la misma extensión de pasos pero sin restricciones posicionales aplicadas. A continuación, se realizaron dos etapas de equilibrado por un periodo de 50 nanosegundos cada una. Esto con restricciones en el *backbone* de la proteína y moléculas de PIP<sub>2</sub>, con una energía de 0,23 *kcal/mol*, sólo durante el primer equilibrado. Para posteriormente liberar todas las restricciones en el segundo equilibrado (ver en la Figura 13). Finalmente, para cada uno de los sistemas generados (15 sistemas en total) se realizaron simulaciones de producción con un tiempo total de 1  $\mu$ s (cada simulación) para evaluar los contactos de PIP<sub>2</sub> con la proteína.



**Figura 13: Desviación cuadrática media (RMSD) de las estructuras de proteínas en función del tiempo de equilibrado:** Los primeros 50 nanosegundos representan al primer equilibrado que posee restricciones en el *backbone* de las proteínas. Los nanosegundos restantes muestran los valores de RMSD de una segunda dinámica molecular sin restricciones.

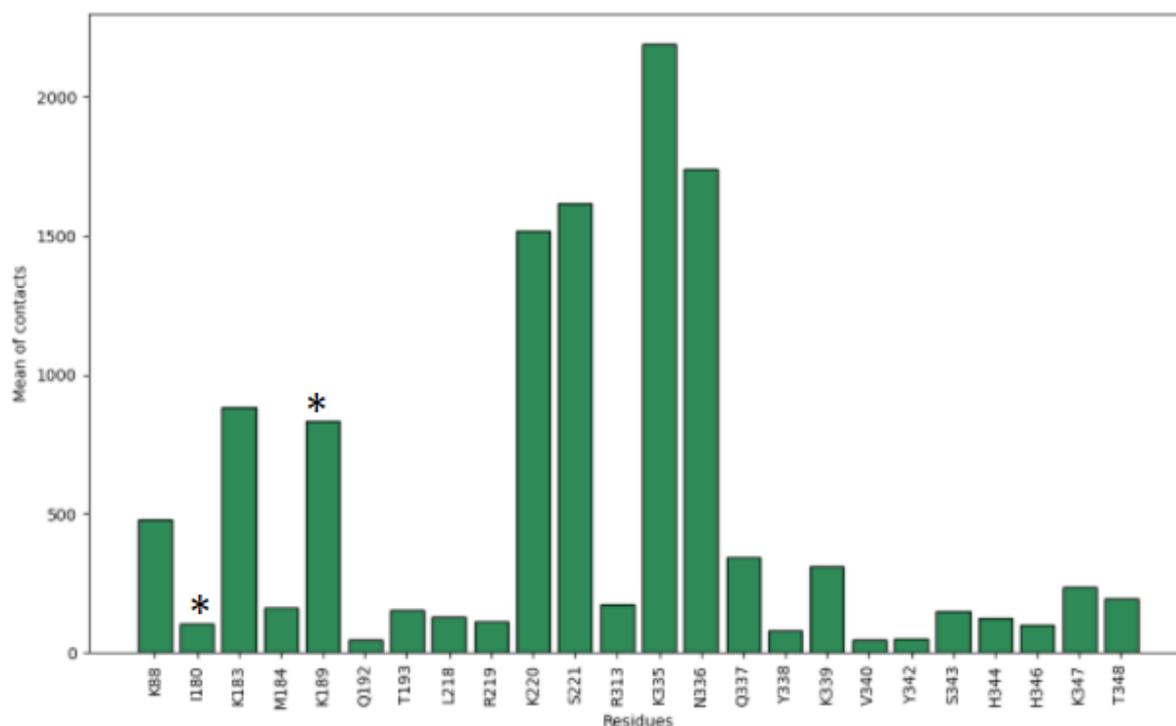
### 5.3. Identificación de sitios de anclaje de PIP<sub>2</sub> en canales de interés

Para determinar los sitios de unión de PIP<sub>2</sub> en las proteínas de interés, se analizaron las dinámicas moleculares de grano grueso, en las cuales para todos los canales, las moléculas de PIP<sub>2</sub> migran desde sus posiciones iniciales en la bicapa lipídica para interactuar de forma casi-permanente con el canal. De esta forma, para definir cada contacto, se utilizó un límite de distancia de 6Å entre el grupo fosfato de PIP<sub>2</sub> (“cabeza”) y cada aminoácido de los canales en estudio. Más en detalle, en la figura 14 se muestra la sumatoria total de contactos de PIP<sub>2</sub> en cada réplica de dinámica molecular (TRPV1, TRP1, TRPM8, TRPC6, Kir 2.2), en función del tiempo de simulación, el cual sugiere que este fosfolípido tiende a unirse en la proteína, comprobando así su afinidad por cada canal en estudio y su facilidad para difundir dentro de la membrana.



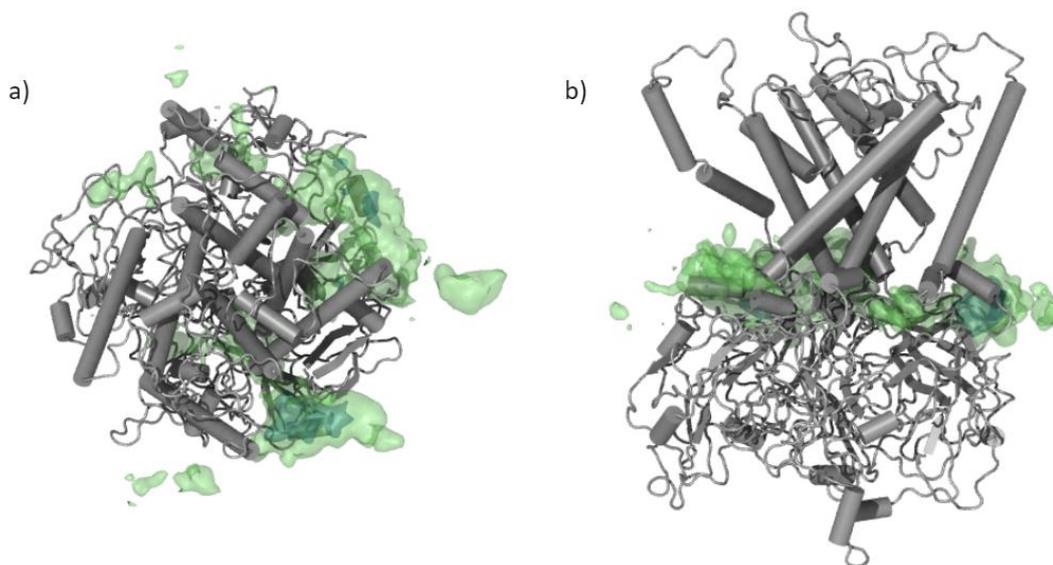
**Figura 14: Sumatoria de contactos de PIP<sub>2</sub> con las proteínas en estudio:** Las curvas representan la sumatoria total de contactos de PIP<sub>2</sub> con las proteínas en función del tiempo. Para cada sistema se realizó el análisis de manera individual por cada réplica de dinámica molecular.

Como prueba de concepto y validación de la metodología a emplear se utilizó el canal Kir2.2, en el cual se ha estudiado extensamente el mecanismo de unión de PIP<sub>2</sub>, esto por estrategias computacionales y experimentales.<sup>42,45,48</sup> Hansell y colaboradores<sup>48</sup> identificaron los aminoácidos R80, W79, R78 y K189 como esenciales para el acoplamiento de PIP<sub>2</sub> y posterior modulación de la función del canal. Se simuló el canal Kir 2.2 y bajo las mismas condiciones los canales TRPV1, crTRP1, TRPC6 y TRPM8. Para Kir 2.2 se logró identificar que las moléculas de PIP<sub>2</sub> interactúan preferencialmente con los residuos K80 y K189, lo cual concuerda con los aminoácidos previamente descritos en literatura como parte del sitio de unión de PIP<sub>2</sub>. La figura 15 muestra los contactos realizados por la cabeza de PIP<sub>2</sub> con las cadenas laterales del canal Kir 2.2, resaltando una mayor tasa de contactos con residuos básicos, pero además una tendencia a interactuar con los aminoácidos cercanos al sitio de unión de PIP<sub>2</sub>.



**Figura 16: Contactos de PIP<sub>2</sub> con Kir 2.2 en simulaciones CG:** Contactos realizados por el grupo fosfato de PIP<sub>2</sub> con la proteína cuantificados por un promedio de contactos. Los residuos marcados con un asterisco (\*) son los aminoácidos propuestos como sitios de unión por el grupo de Hansell.

Con la finalidad de facilitar el entendimiento de los resultados, en la figura 17 se muestra a modo de ejemplo, la proyección a nivel tridimensional de los contactos identificados. Adicionalmente, en la figura suplementaria 2 (ver anexo) se muestran los gráficos de barras que representan los contactos observados para los canales TRPC6, TRPM8, TRP1. Todos los gráficos de barra fueron realizados con la librería *matplotlib* de Python3.<sup>82,83</sup>



**Figura 17: Distribución espacial del contacto de Kir 2.2 con PIP<sub>2</sub>:** La superficie que se muestra en la imagen, encierra a todas las regiones ocupadas por PIP<sub>2</sub> durante la dinámica molecular. a) Vista superior de las zonas visitadas por el lípido. b) Vista frontal de las regiones ocupadas por PIP<sub>2</sub>.

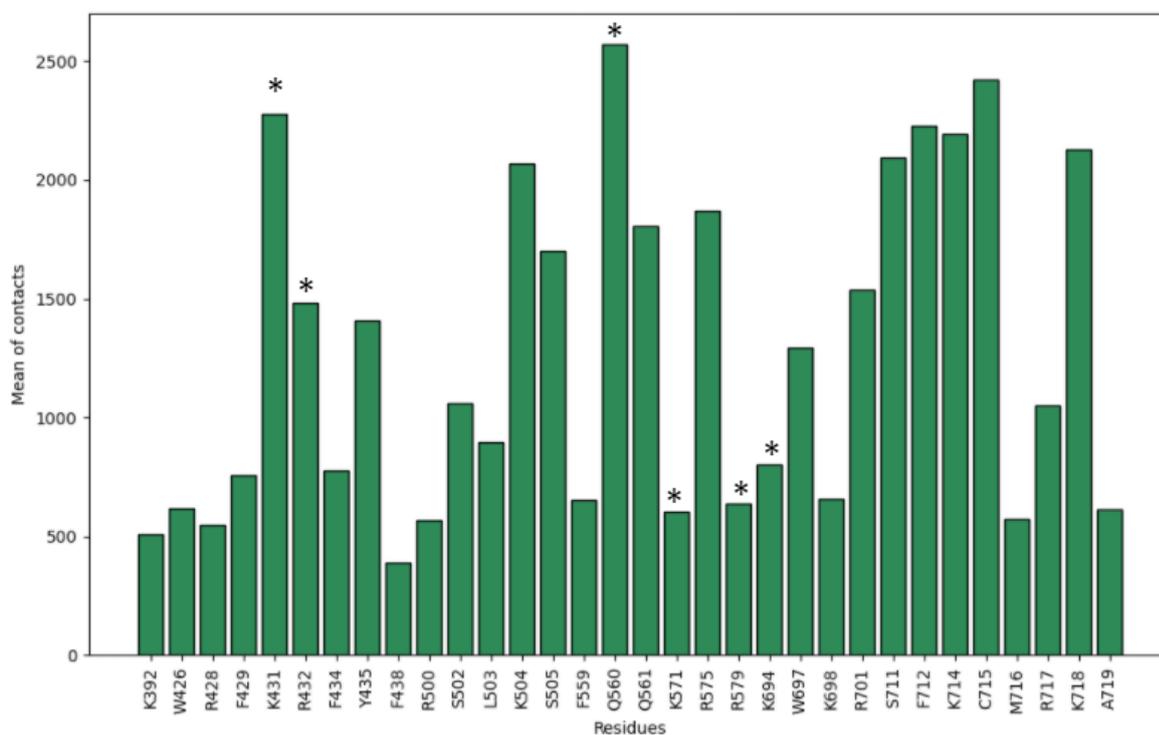
Con el objetivo de evaluar y verificar los potenciales sitios de unión de PIP<sub>2</sub> en miembros de la familia TRP, se analizaron los canales TRPV1, crTRP1, TRPC6 y TRPM8. Para el caso de TRPV1, la figura 18 muestra que existieron contactos principalmente entre Argininas y Lisinas, para todas las sub-unidades de este canal. Entre los distintos aminoácidos que presentan contactos con PIP<sub>2</sub> se destacan (asteriscos) los aminoácidos Q560, K571, R579, K694, R701 (ver MS2), los cuales han sido descritos previamente por Poblete y colaboradores.<sup>54</sup> Cabe destacar, que en este reporte, el sitio de unión de PIP<sub>2</sub> fue validado por métodos computacionales y mutaciones sitio dirigidas a nivel experimental.<sup>17-18</sup> Adicionalmente, en el año 2016, el grupo de David Julius reportó una estructura cristalográfica del canal TRPV1 en complejo con PIP<sub>2</sub>, el cual resalta la importancia de los aminoácidos L515, V518, M547 y I573 como cruciales para la estabilización de interacciones hidrófobas que generan moléculas endógenas,<sup>16</sup> los cuales no fueron visitados en estas dinámicas por este lípido.<sup>16</sup> Por otro lado y de forma muy interesante, se identificaron dos aminoácidos (K431 y R432) localizados en el segmento S1 del extremo C-terminal, los cuales podrían jugar el rol de una “antesala” previo al anclaje de PIP<sub>2</sub> en el sitio de unión. Estos aminoácidos denominados como “sitio periférico” muestran una alta densidad de contactos, y facilitan el ingreso al sitio de inhibición. Este sitio periférico se localiza en el inicio (porción intracelular) del segmento S1, muy cercano al sitio

de activación por capsaicina, siendo un sitio altamente expuesto al solvente y con una afinidad menor por PIP<sub>2</sub> que el sitio de unión. Se propone que este grupo de aminoácidos podrían ser de vital importancia en el proceso de inhibición del canal TRPV1 mediado por PIP<sub>2</sub>.<sup>95</sup>

Para el canal crTRP1 (ver MS1), el grupo de McGoldricken el año 2020 reportó una estructura co-cristalográfica del complejo crTRP1-PIP<sub>2</sub>,<sup>61</sup> describiendo un sitio de unión compuesto por los aminoácidos K432, S443, L444. En la figura MS1, obtenida de las simulaciones tipo CG, se observa una gran cantidad de contactos de PIP<sub>2</sub> con los aminoácidos K432, S443 y L444, sobre todo con los dos primeros. Estos tres residuos son descritos como el sitio de anclaje para este lípido, de esta forma los métodos computacionales están en concordancia con la información reportada experimentalmente. Cabe destacar que sólo un sitio de unión fue ocupado por moléculas de PIP<sub>2</sub>, en la cual cada fosfolípido ingresó de manera independiente y única.

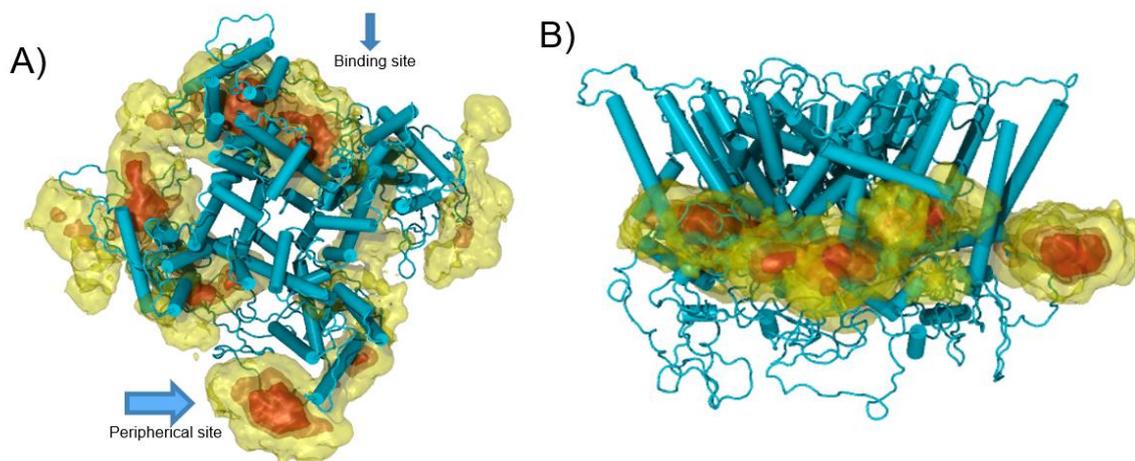
Para el canal TRPC6 (ver MS3), se encontraron interacciones con aminoácidos de interés como K431, M432, K434 con una gran cantidad de contactos durante la dinámica molecular. Pero difiere de la información descrita por literatura que caracteriza interacciones en este canal con el residuo S448,<sup>96</sup> por ende, no se puede definir un sitio de unión, pero sí una zona densa de contactos con aminoácidos básicos que se sitúan en los alrededores del sitio de unión, pero que a su vez dificultan la penetración de PIP<sub>2</sub> al sitios de unión reportado para este canal.

De la misma forma, para el canal TRPM8 (ver MS2), por metodologías tipo *coarse-grained* se identificaron los residuos K721, T722, K723, K724, que sugieren la presencia de un posible sitio de unión. Sin embargo, al igual que en el caso de TRPC6, para TRPM8 no existe contacto directo con los residuos reportados K995, R999 y R1008 como parte del sitio de unión de PIP<sub>2</sub>.<sup>57</sup> Por otro lado, en este trabajo se propone que los residuos K721, T722, K723, K724, podrían ser considerados como sitios de espera para la posterior penetración al sitio activo, aunque es necesario una mayor cantidad de datos y tiempo de simulación para comprobar esta hipótesis.



**Figura 18: Contactos de PIP<sub>2</sub> con TRPV1 en simulaciones CG:** Contactos realizados por el grupo fosfato de PIP<sub>2</sub> con la proteína cuantificados por un promedio de contactos. Los residuos marcados con un asterisco (\*) son los aminoácidos propuestos como sitios de unión por el grupo de Poblete.

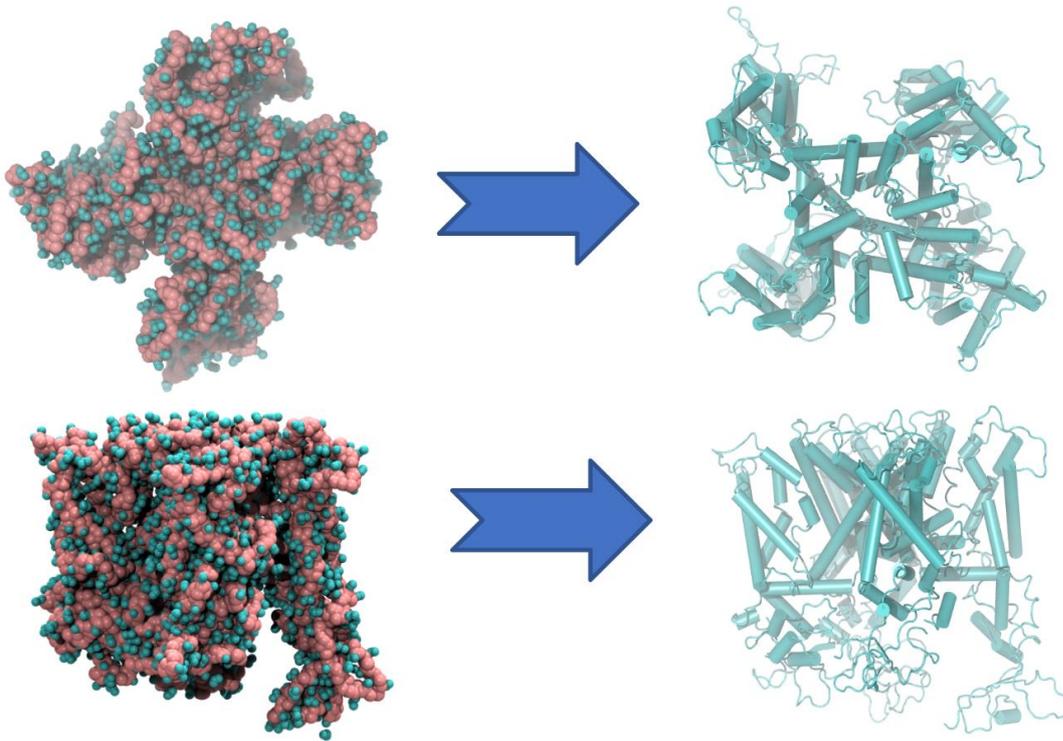
Con la finalidad de facilitar la visualización de los contactos generados por PIP<sub>2</sub> en cada canal, se proyectó la distribución de interacciones PIP<sub>2</sub> de forma tridimensional, utilizando mapas espaciales de contactos. Más en detalle y a modo de ejemplo, la figura 19 muestra la distribución espacial de interacción de PIP<sub>2</sub> al canal TRPV1, mostrando la densidad de contactos en función de una escala de colores, donde una mayor densidad de contactos está en color naranja, mientras que una menor interacción del fosfolípido con la proteína es representada por el color amarillo. Estas distribuciones fueron calculadas midiendo las distancias entre el centro de masa de la cabeza del grupo fosfato de PIP<sub>2</sub> a una distancia de 6 Å de cualquier partícula CG del canal, para todos los pasos de simulación. Adicionalmente, en la Fig. 19 se observa una vista frontal (Fig 19A) y superior (Fig 19B) de la densidad de contactos, destacando los aminoácidos pertenecientes al sitio de unión en color de nube naranja (figura 18).



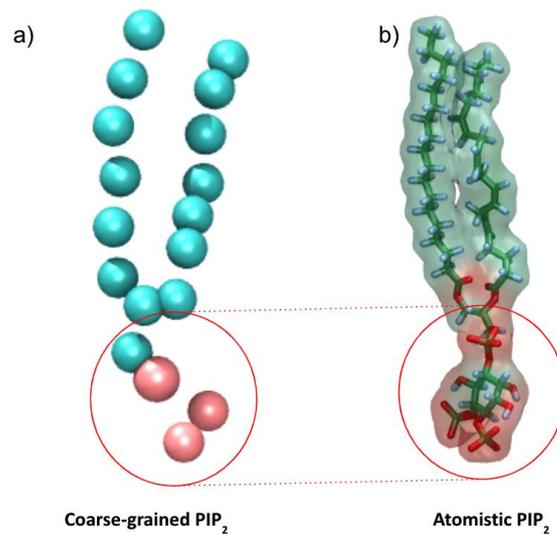
**Figura 19: Distribución espacial del contacto de TRPV1 con PIP<sub>2</sub>:** La superficie que se muestra en la imagen encierra a todas las regiones ocupadas por PIP<sub>2</sub> durante la dinámica molecular. a) Se destacan los sitios tanto de unión como periférico para la unión de PIP<sub>2</sub>. b) Vista frontal de las regiones ocupadas por PIP<sub>2</sub>.

#### 5.4. Simulación atómica de los complejos canal-PIP<sub>2</sub>

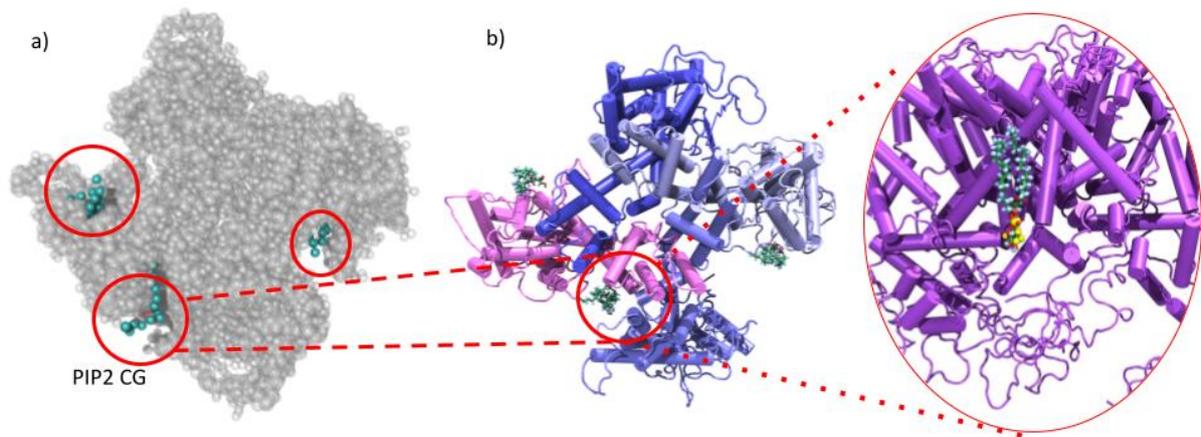
Con el objetivo de corroborar la estabilidad de las conformaciones obtenidas en simulaciones tipo CG, como también de investigar la interacción de PIP<sub>2</sub> con cada canal a un nivel de detalle superior, los sistemas de grano grueso fueron convertidos a una representación atómica, utilizando el plugin “*sirah\_backmap*”,<sup>72</sup> el cual utiliza recursos de AMBER Tools.<sup>83</sup> Así, utilizando la última conformación estructural de la simulación CG como punto inicial, se realizó una “conversión conformacional” para obtener cada uno de los sistemas en una representación atómica (AA). Adicionalmente, con la finalidad de respetar las posiciones de los ligandos (PIP<sub>2</sub>), se realizó un alineamiento estructural entre moléculas de PIP<sub>2</sub> utilizando ambas representaciones (CG y AA), donde se superpuso la posición de la representación atómica por sobre la de grano grueso, respetando las coordenadas espaciales del grupo fosfato de PIP<sub>2</sub> (Fig. 21). A modo de ejemplo se muestra la figura 20, en la cual se realiza la transformación “backmapping” para los canal TRPV1, como también es posible ver en la figura 21 la representación obtenida para el fosfolípido PIP<sub>2</sub>. En la figura 22 se visualiza el ensamble de estos sistemas atómicos.



**Figura 20: Conversión de TRPV1 de grano grueso a modelos atómico:** Vista superior y frontal, a la izquierda las representaciones de la última posición de la dinámica molecular (CG) de la proteína TRPV1, y en la izquierda la representación atómica de estas coordenadas espaciales.



**Figura 21: Backmapping moléculas de PIP<sub>2</sub>:** a) Representación de grano grueso para el campo de Fuerza SIRAH. B) Representación atómica para el campo de fuerza CHARMM36. En círculos rojos se muestran las zonas que caracterizan a los grupos fosfatos de estos lípidos, los cuales fueron utilizados como referencia para la superposición estructural de estas moléculas.



**Figura 22. Ensamblado de sistemas atomísticos:** a) Estructura final de la dinámica molecular de TRPV1/ PIP<sub>2</sub> en CG, donde en círculos rojos se visualizan las moléculas de PIP<sub>2</sub> embebidas en sitios de la proteína. b) TRPV1 en representación atomística, en el círculo rojo se visualiza la posición de la molécula de PIP<sub>2</sub>, en color amarillo el grupo fosfato. En un círculo rojo acercado se puede visualizar el posicionamiento final de este.

Posteriormente, los complejos de proteínas con PIP<sub>2</sub> fueron ensamblados de la misma manera que en el protocolo descrito en *Materiales y Métodos 4.1.*, utilizando el campo de fuerza CHARMM36, respetando las mismas condiciones y dimensiones de cajas periódicas. En una primera instancia, se realizó una minimización estructural de 50.000 pasos aplicando una restricción espacial al *backbone* de la proteína, seguido por un proceso de equilibrado estructural del sistema por 8ns. Finalmente, para cada uno de los sistemas generados se realizaron simulaciones de producción con un tiempo total de 50 ns para analizar los contactos de PIP<sub>2</sub> con las proteínas.

En un principio, para el canal Kir2.2, se presentan contactos importantes de PIP<sub>2</sub> con los residuos R80, K189, K335, relacionándose tanto con lo reportado en literatura como lo que se visualizó en las dinámicas moleculares de grano grueso para este complejo. En la Figura MS5, se muestra un gráfico de barras para la cuantificación de contactos entre Kir2.2 y PIP<sub>2</sub>, identificando que el dominio R78, W79, R80 mantiene una gran cantidad de contactos en comparación con simulaciones CG, resaltando la importancia de dichos aminoácidos por sus

características básicas, lo cual facilita la unión y posterior inhibición/activación del canal cuando esté lípido interactúa con estos residuos.

Dentro de los canales de la familia TRP, en TRPV1, se encontró una alta densidad de contactos en aminoácidos como K408, R409, I410, K431, R500, K571, R632 y R701 (ver Fig. MS6). Al igual que en la dinámica molecular de grano grueso, se demostró que existen aminoácidos que son preferentes en el anclaje de este lípido en la proteína y favorecen la activación de este canal como K431, K571 y R701. En la figura MS6 se visualizan más en detalle los contactos de PIP<sub>2</sub> con TRPV1, donde la densidad de contactos está concentrada en aminoácidos de carácter básico descritos anteriormente como sitios de anclaje para este lípido.

En el caso de crTRP1, PIP<sub>2</sub> mostró una mayor probabilidad de contactos con los aminoácidos R127, K431, S433, T467, y L581, localizados en el entorno del potencial sitio de unión que se describe para este canal. Particularmente, los residuos K442, S443 y F446, también fueron encontrados en las simulaciones de CG. En este punto, es importante recalcar que las interacciones electrostáticas con el residuo K442 nos demuestra lo encontrado por el grupo de McGoldrick que define a este aminoácido como vinculante para la activación de este canal, y este residuo es conservado en otros miembros de la familia TRP. En la figura MS7, se muestran los principales contactos de manera detallada, destacando la tendencia de PIP<sub>2</sub> por aminoácidos básicos y aromáticos, lo que posiblemente es originado por la formación de interacciones electrostáticas entre la cabeza polar de PIP<sub>2</sub> y los residuos R127, K442, S443, y F446.

En el caso del canal TRPC6, se encontró una zona densa de contactos la cual comprende a los aminoácidos Q198, S199, G200, L201, Q202 (ver MS8). En este caso, K263 y K441 en ambas dinámicas moleculares se repiten, pero en probabilidades de contactos muy dispares. Aunque es conocida la interacción de PIP<sub>2</sub> en canales de la familia TRPC, en general,<sup>41</sup> no han sido explorados los efectos de este lípido en los miembros de esta familia por lo cual, no existe información que nos permita comparar lo encontrado en este trabajo. Más en detalle, las simulaciones realizadas a este canal nos podrían orientar hacia futuros

experimentos que pudiesen confirmar lo encontrado en este proyecto de tesis, y así validar la importancia de los residuos K263 y K441 en la unión de PIP<sub>2</sub> a TRPC6.

Para el canal TRPM8, se identificó una zona de contactos, la cual contiene aminoácidos aminoácidos tales como S731, P736, T734, los cuales no se correlacionan con lo encontrado en la dinámica de grano grueso para este canal, pero estos residuos podrían formar puentes de hidrógeno con PIP<sub>2</sub> en este lugar, y de esta forma se permite localizar zonas de interés en este canal alrededor de las subunidades que conforman este canal. Más en detalle, se puede visualizar en la figura MS9, los aminoácidos con los que mantuvo contacto PIP<sub>2</sub> durante el tiempo de dinámica molecular. El sitio de unión reportado para este canal está formado por los aminoácidos K995, R999 y R1008, los cuales no fueron visitados por PIP<sub>2</sub> a lo largo de las dinámicas moleculares realizadas en esta memoria de título. Esto puede ser explicado ya que los aminoácidos reportados como el bolsillo de unión se localizan en cavidades internas del canal, en particular situadas entre el segmento S4 y S6, por lo que en el tiempo simulado no fue posible observar eventos de acople. Cabe considerar que, la gran mayoría de los contactos observados fueron en zonas cercanas al sitio activo reportado en bibliografía.

## **5.5. Análisis de secuencias biológicas de canales TRP**

Con el objetivo de encontrar un dominio aminoacídico común para la unión de PIP<sub>2</sub>, se realizó un alineamiento global de secuencias biológicas de toda la familia de canales TRP, utilizando la información descrita en el punto 4.5. En la Figura 23 se muestra el alineamiento global de toda la familia TRP incluyendo también el canal Kir 2.2. Se destaca en rojo el dominio “TRP-Box”, el cual es un grupo de aminoácidos característicos (“EWKFAR”) y está presente la mayoría de los miembros de la familia TRP.<sup>92</sup> Adicionalmente, se identificó un potencial sitio de unión para PIP<sub>2</sub> compuesto por los aminoácidos K694, R701 y R705 en el alineamiento para el canal TRPV1, el cual está conservado para este subgrupo de canales dependientes de Vaniloide (TRPV). De esta forma se propone la PIP<sub>2</sub>BOX que se muestra en la figura 24 en un recuadro negro con residuos conservados a nivel de secuencias para esta familia. K694 se conserva en la mayoría de los miembros de la familia TRPV, pero es importante considerar que este aminoácido está presente en una región conservada en otros miembros de esta familia, lo que sugiere que la mayoría de los miembros pudiesen tener afinidad por este lípido.

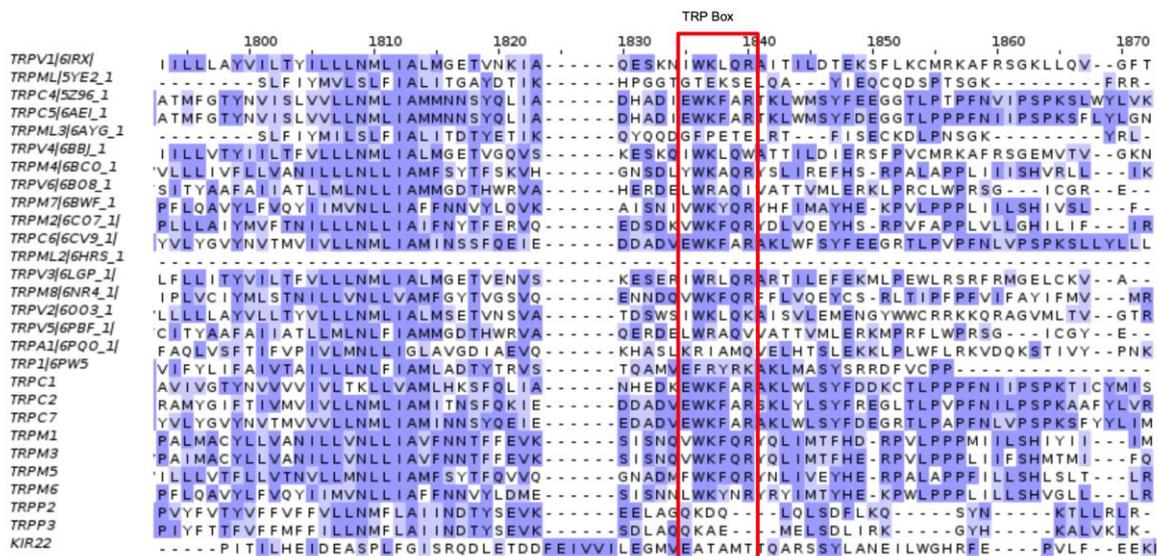


Figura 23: Alineamiento global de secuencias de familia TRP: El cuadro rojo nos muestra la caja TRP que caracteriza a miembros de esta familia a nivel de secuencias.

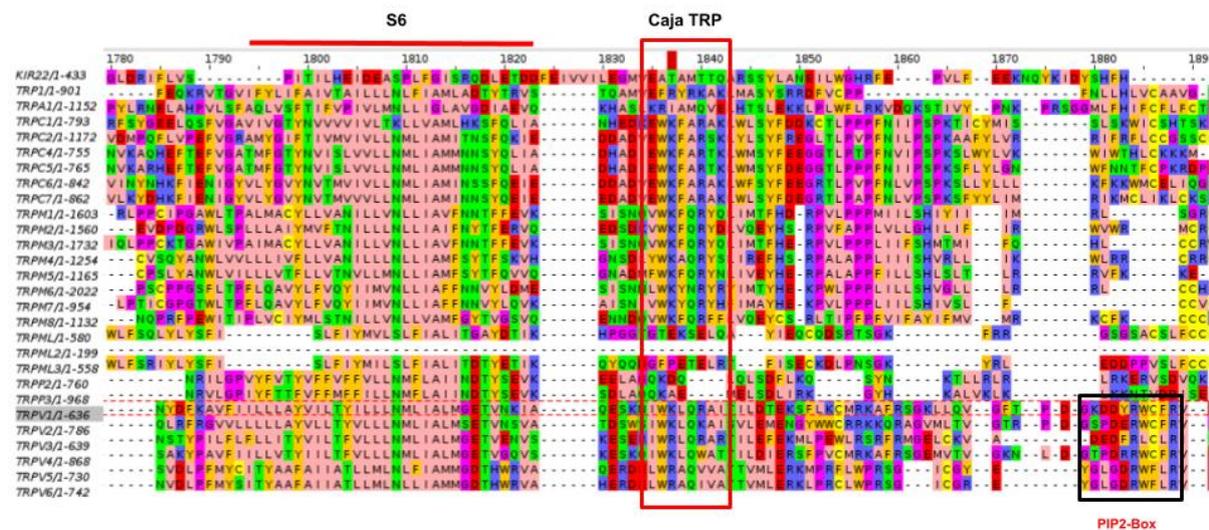


Figura 24: Alineamiento de secuencias para canal TRPV1: La línea roja muestra el segmento S6 del alineamiento. En rojo se muestra la caja TRP, y en un cuadrado negro se muestra la caja PIP2-Box.

A pesar del análisis y agrupamiento por familia, no es claro a nivel de secuencia que exista algún dominio característico de reconocimiento de PIP<sub>2</sub>. Según lo observado a nivel estructural, los aminoácidos que componen el sitio de unión de PIP<sub>2</sub> muchas veces pertenecen a distintos segmentos del canal, como también a diversas subunidades de la estructura tridimensional. Es por lo anterior, que se sugiere la necesidad de obtener una mayor cantidad

de información estructural que de indicios de residuos claves en distintas familias de canales TRP, con lo cual orientar el estudio a nivel de secuencias.

## 6. Conclusión

El efecto biológico que PIP<sub>2</sub> genera sobre los canales miembros de la familia TRP es un gran tema de discusión considerando que la literatura reporta que la unión de PIP<sub>2</sub> en canales iónicos tales como TRP1, TRPV1, TRPM8, TRPC6 y Kir 2.2 permite la modulación de la actividad de estos. En base a lo anterior, se sugiere que a pesar de que la función de cada canal es distinta, podría existir un sitio de unión a PIP<sub>2</sub> en común, el cual ayuda a la identificación de futuros miembros de la familia TRP. Frente a esto, el incremento de estructuras cristalográficas de canales TRP co-cristalizadas con PIP<sub>2</sub> ha ayudado a investigar a nivel atómico las propiedades que podrían caracterizar a los sitios de unión en diversos miembros de la familia TRP.<sup>92</sup> El uso de herramientas computacionales y bioinformáticas ha sido de gran ayuda al momento de investigar las principales interacciones que controlan la unión de este fosfolípido. En este trabajo de tesis se ha logrado concluir que:

Utilizando la metodología de modelado de grano grueso, fue posible modelar el macrocomplejo canal-PIP<sub>2</sub>-membrana y agua en un número simplificado de átomos, en comparación al modelado “*full-atom*”. De esta manera se logró aumentar el tiempo de simulación, utilizando a su vez, menos recursos computacionales y más muestreo conformacional en rangos de microsegundos. Por otro lado, en una etapa posterior a las simulaciones CG, fue posible realizar el proceso de *backmapping*, en el cual se recuperaron conformaciones con detalle atómico provenientes desde simulaciones CG. De esta manera, fue posible comparar nuestros resultados utilizando 2 aproximaciones de simulación molecular, identificando en ambas las zonas con una mayor densidad de contactos de PIP<sub>2</sub> con las proteínas en estudio.

En base a nuestros resultados, fue posible identificar y validar los sitios de unión ya reportados experimentalmente en los canales Kir2.2, TRPV1 y TRP1 en las dinámicas de CG y AA. Por otro lado, a pesar de que en el muestreo conformacional PIP<sub>2</sub> efectivamente visitó la periferia de los bolsillos de unión de los canales TRPC6 y TRPM8 no se identificaron eventos de anclaje en los sitios propuestos por literatura. Se postula que la imposibilidad de observar un acoplamiento molecular espontáneo en el sitio de unión de los canales TRPC6 y TRPM8,

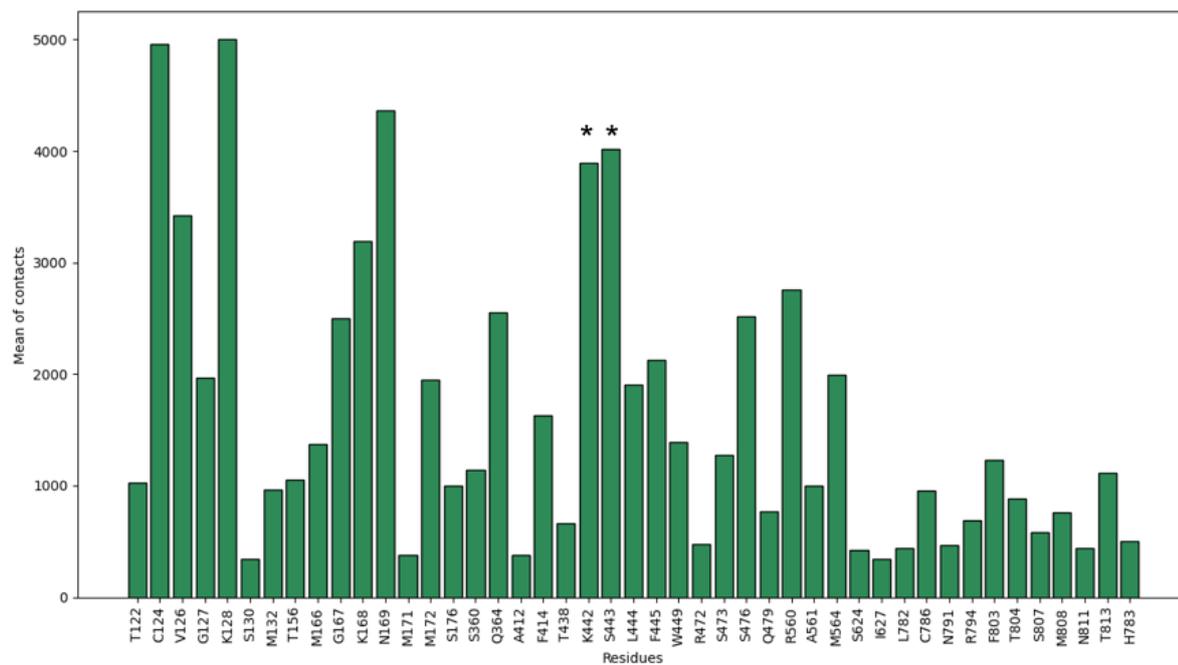
se puede atribuir a artefactos electrostáticos generados por la simplificación de los sistemas a conformaciones del tipo *coarse-grained*, así como también a la necesidad de un mayor tiempo de simulación para alcanzar el ingreso de moléculas de PIP<sub>2</sub> a los sitios de unión.

Cabe destacar que en todos los casos explorados el fosfolípido PIP<sub>2</sub> siempre prefirió estar en contacto con los canales estudiados por sobre difundir libremente en la membrana celular, lo cual da cuenta de una “afinidad” del fosfolípido por estos canales. Esta tendencia abre la puerta a explorar en mayor profundidad la existencia de sitios periféricos que podrían facilitar la entrada de estos ligandos para cumplir el rol de modulación de estos canales. Lo anterior se visualiza en canales como TRPV1 y TRPM8, donde PIP<sub>2</sub> visitó sitios ubicados en el exterior de los tetrámeros. Sólo en TRPV1 logró ingresar al sitio de unión, mientras que en TRPM8 no logra visitar los sitios de unión reportados.

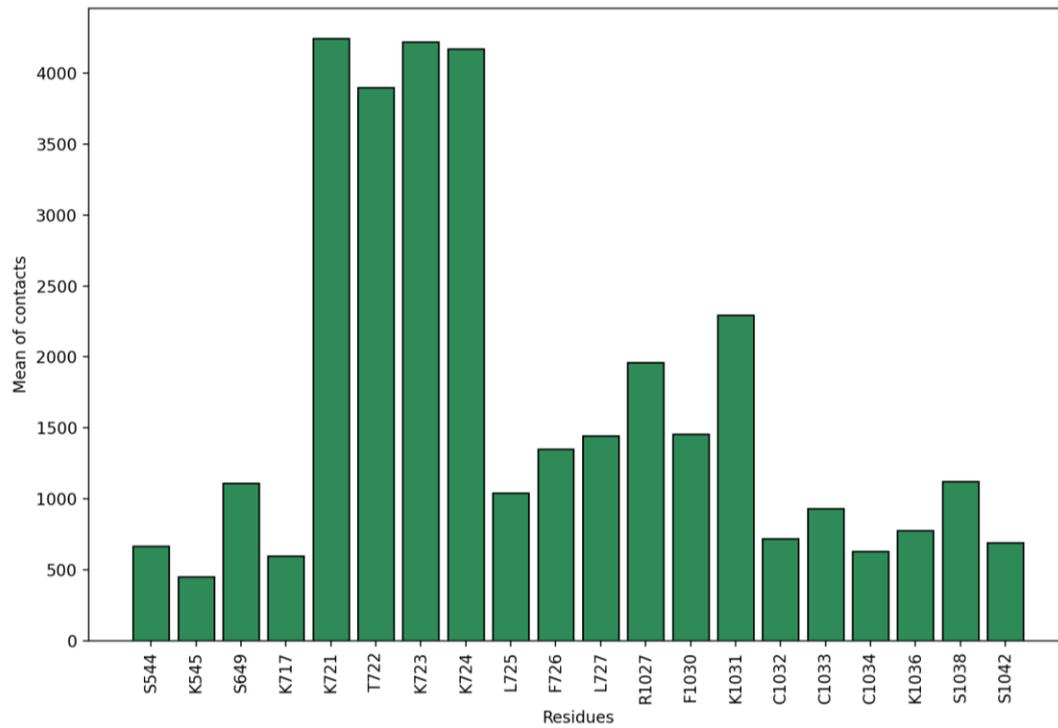
Dado lo reportado en el análisis de secuencias biológicas se sugiere que este proceso debe ser aún más exhaustivo. Utilizando un análisis de secuencia global no se encontraron patrones que indiquen la existencia de un sitio común de unión de PIP<sub>2</sub> para toda la familia de canales TRP. Aún así, mediante el análisis de subfamilias por separado, es posible identificar algunos dominios que podrían indicar la existencia de un sitio de unión para PIP<sub>2</sub>, pero deben ser confirmados por alineamientos estructurales. No es clara la teoría de que el canal crTRP1 sea un ancestro común. Debería ser estudiado y comparado con cada familia para encontrar similitudes respecto a la unión de PIP<sub>2</sub>. Finalmente, se postula que la relación entre canales TRP y PIP<sub>2</sub> responde a las características fisicoquímicas de los lípidos y a interacciones electrostáticas generadas entre la cabeza polar de PIP<sub>2</sub> y aminoácidos básicos que componen los diversos sitios de unión.

## Anexo

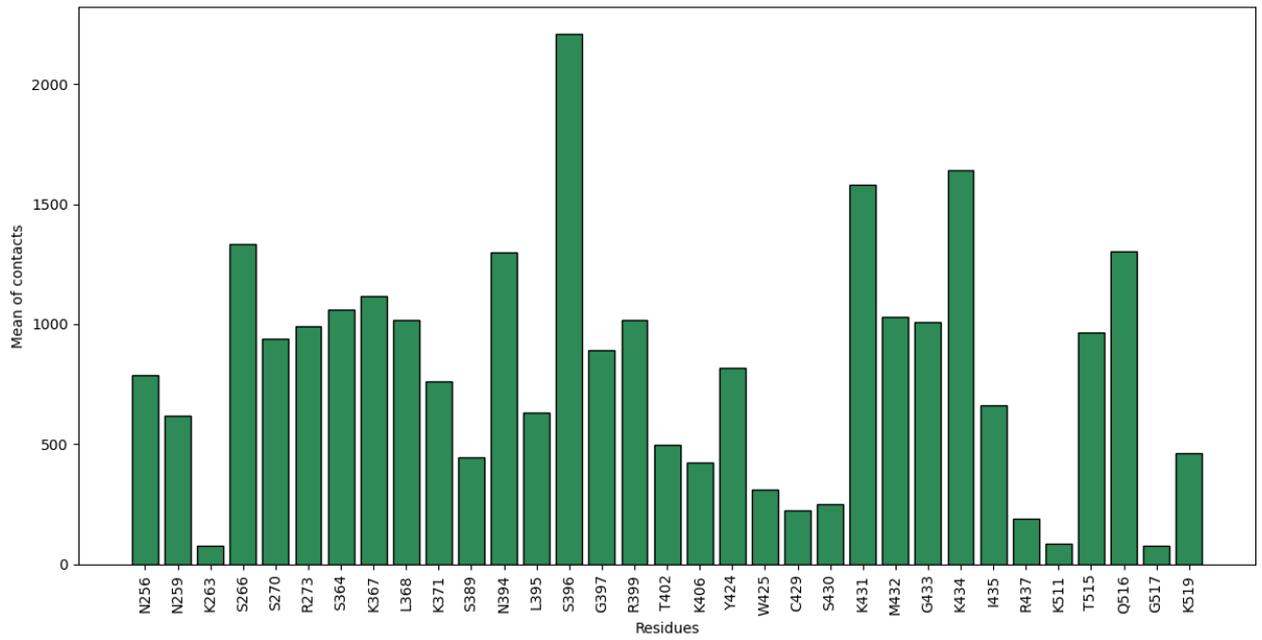
**Material Suplementario, 1.** Gráficos de barra de contactos en canales en dinámicas de grano grueso para TRPM8, TRPC6 y TRP1.



**Figura MS1:** El eje X nos muestra los aminoácidos con mayor cantidad de contactos y el eje Y nos muestra el valor asociado a cada barra. Las barras con asteriscos (\*) son residuos que pertenecen a los sitios de unión de este canal.

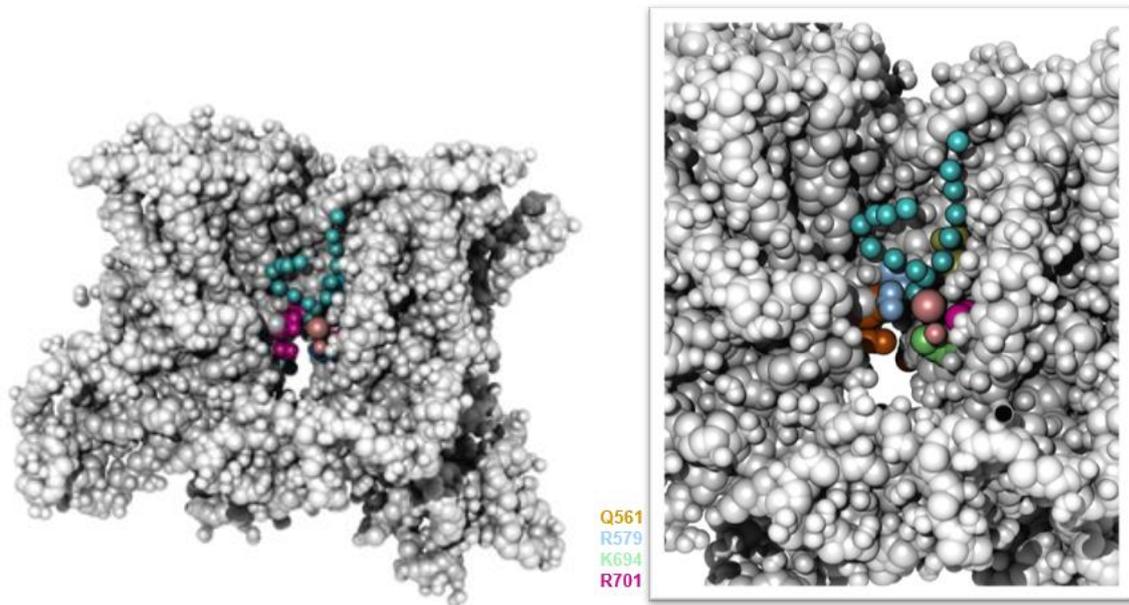


**Figura MS2: Contactos promedios de PIP<sub>2</sub> con TRPM8:** El eje X nos muestra los aminoácidos con mayor cantidad de contactos y el eje Y nos muestra el valor asociado a cada barra.



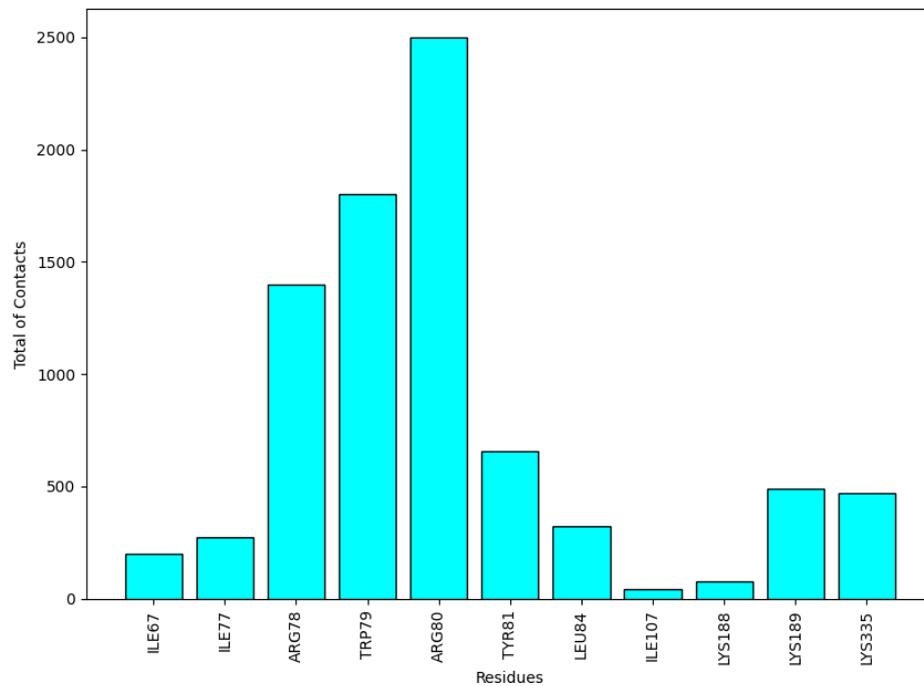
**Figura MS3: Contactos promedios de PIP<sub>2</sub> con TRPC6:** El eje X nos muestra los aminoácidos con mayor cantidad de contactos y el eje Y nos muestra el valor asociado a cada barra.

**Material Suplementario, 2.** Sitio de unión predicho en simulaciones de grano grueso para canal TRPV1.

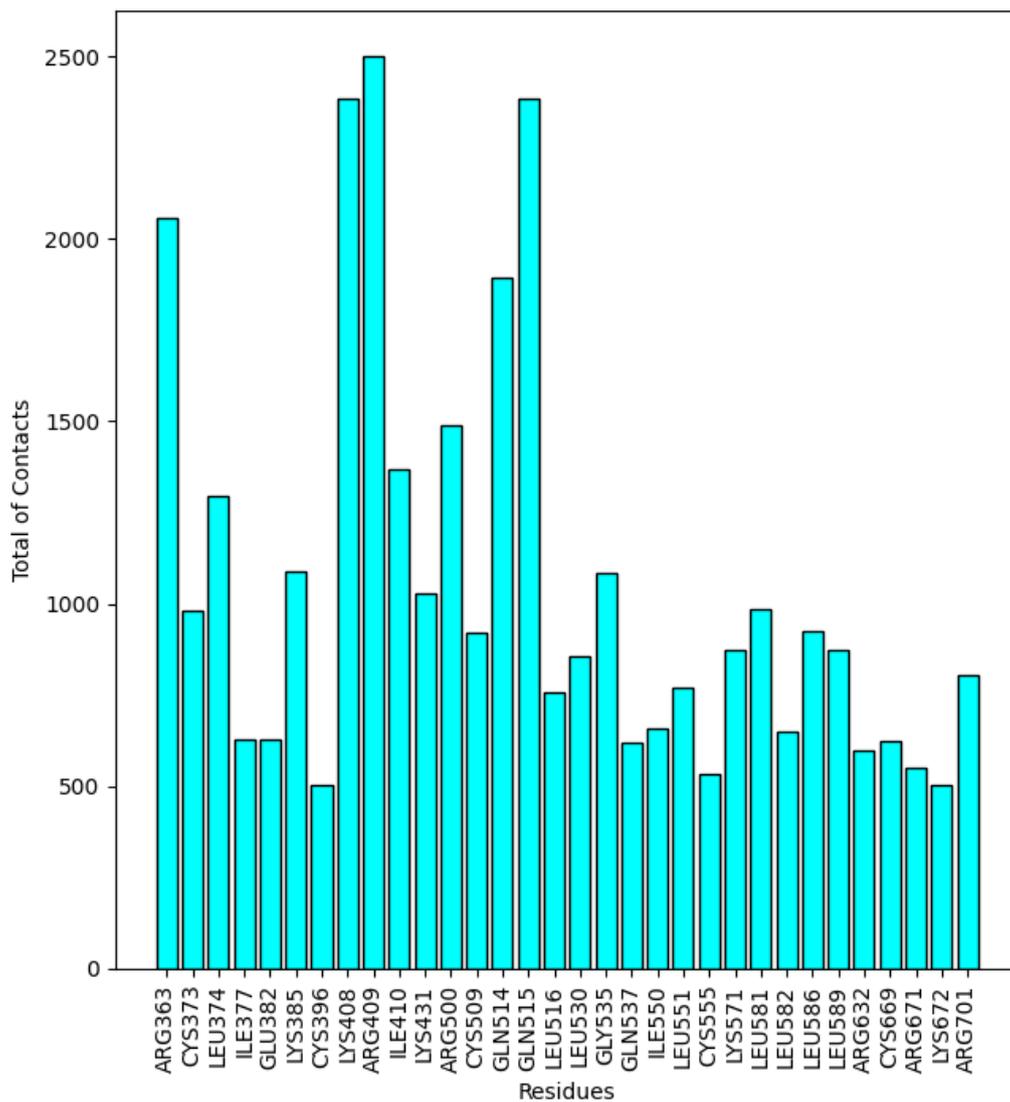


**Figura MS4: Bolsillo de unión de PIP<sub>2</sub> en canal TRPV1.** La figura a la izquierda nos muestra cómo el fosfolípido está embebido en el pocket de unión. La imagen de la derecha nos muestra la unión de PIP<sub>2</sub> con los residuos Q561(naranja), R579(celeste),K694(verde), R701(rosado oscuro).

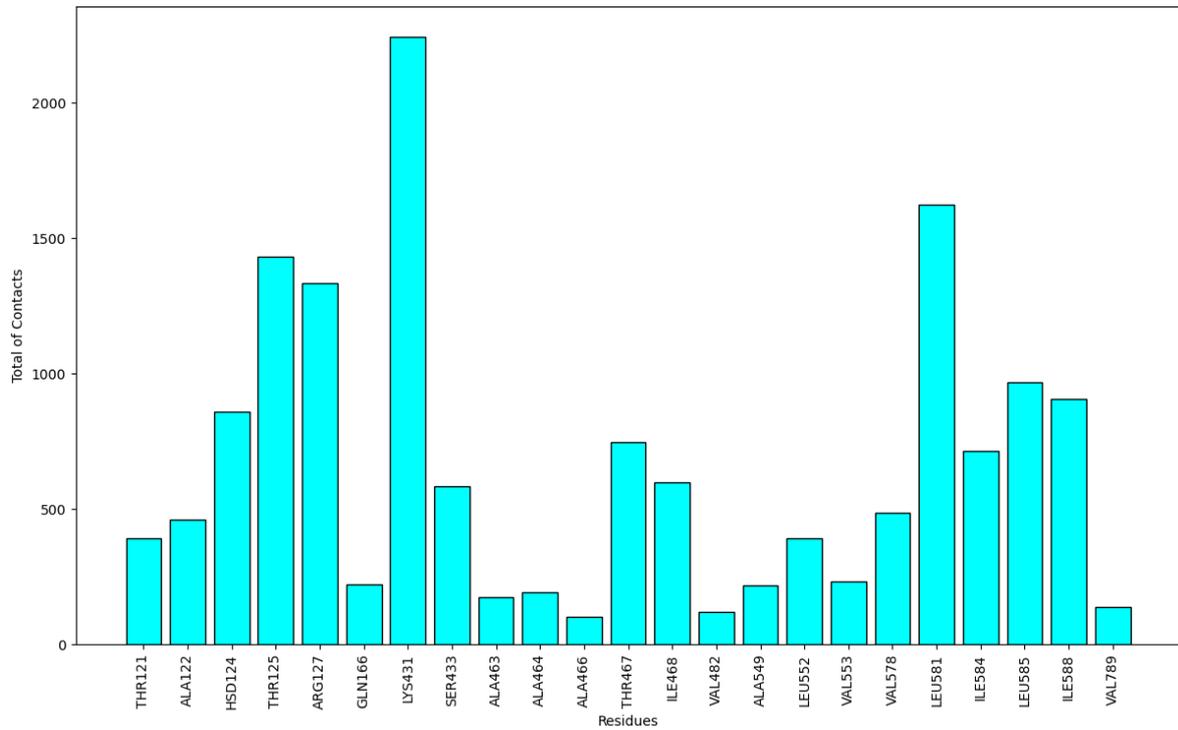
**Material Suplementario, 3.** Gráficos de barra de contactos en canales en dinámicas moleculares atomísticas de Kir 2.2, TRPV1, crTRP1, TRPM8 y TRPC6.



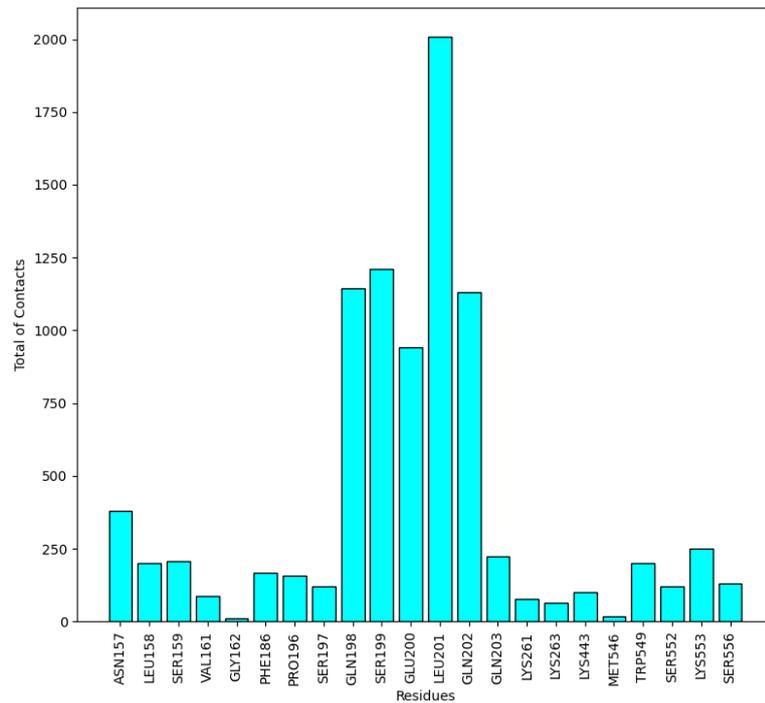
**Figura MS5: Contactos de PIP<sub>2</sub> con Kir 2.2 en dinámicas atomísticas:** El eje X nos muestra los aminoácidos con mayor cantidad de contactos y el eje Y nos muestra el valor asociado a cada barra



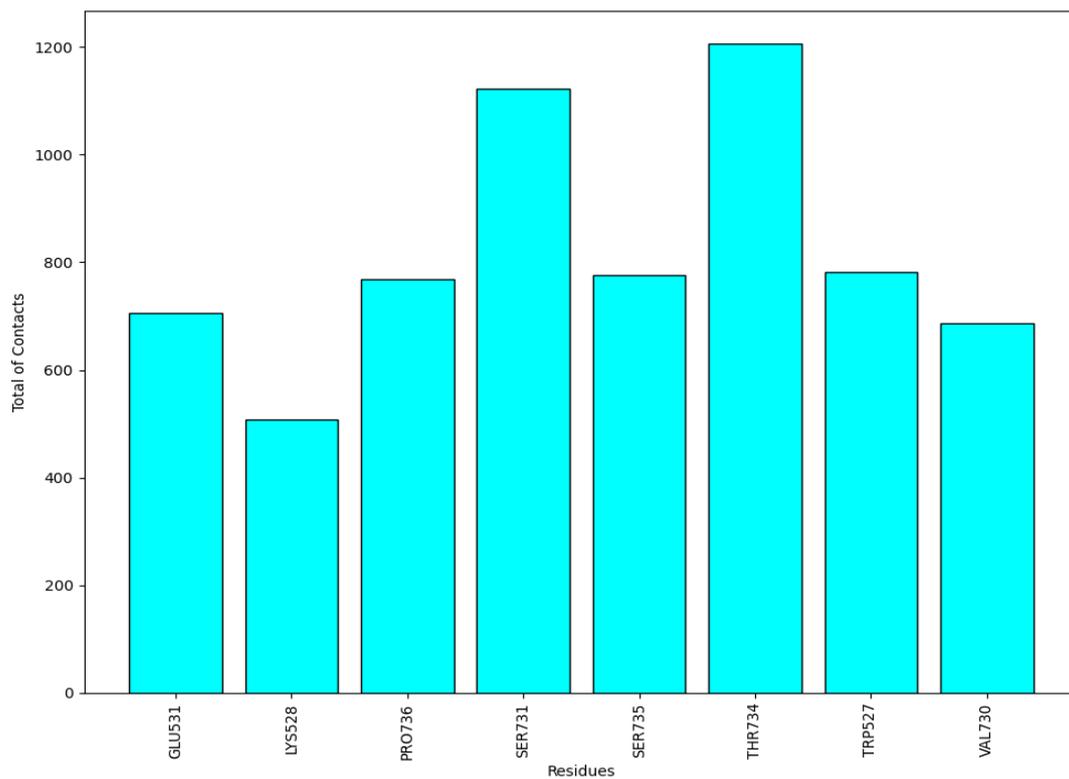
**Figura MS6: Contactos de PIP<sub>2</sub> con TRPV1 en dinámicas atomísticas:** El eje X nos muestra los aminoácidos con mayor cantidad de contactos y el eje Y nos muestra el valor asociado a cada barra.



**Figura MS7: Contactos de PIP<sub>2</sub> con TRP1 en dinámicas atomísticas:** El eje X nos muestra los aminoácidos con mayor cantidad de contactos y el eje Y nos muestra el valor asociado a cada barra



**Figura MS8: Contactos de PIP<sub>2</sub> con TRPC6 en dinámicas atomísticas:** El eje X nos muestra los aminoácidos con mayor cantidad de contactos y el eje Y nos muestra el valor asociado a cada barra



**Figura MS9: Contactos de PIP<sub>2</sub> con TRPM8 en dinámicas atomísticas:** El eje X nos muestra los aminoácidos con mayor cantidad de contactos y el eje Y nos muestra el valor asociado a cada barra

## Bibliografía

1. Martínez LG, Cárdenas RDS, García SV, Conceiro EM. Canales iónicos Receptores de Potencial Transitorio y su papel protagónico en la terapia analgésica. *Rev Cuba Investig Bioméd.* 2015;34(3):278-288.
2. Hung C-Y, Tan C-H. TRP Channels in Nociception and Pathological Pain. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1099:13-27. doi:10.1007/978-981-13-1756-9\_2
3. González-Ramírez R, Chen Y, Liedtke WB, Morales-Lázaro SL. TRP Channels and Pain. In: Emir TLR, ed. *Neurobiology of TRP Channels.* Frontiers in Neuroscience. CRC Press/Taylor & Francis; 2017. Accessed December 14, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK476120/>
4. Caterina MJ, Pang Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharm Basel Switz.* 2016;9(4). doi:10.3390/ph9040077
5. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest.* 2010;120(11):3760-3772. doi:10.1172/JCI42843
6. Steinberg X, Lespay-Rebolledo C, Brauchi S. A structural view of ligand-dependent activation in thermoTRP channels. *Front Physiol.* 2014;5. doi:10.3389/fphys.2014.00171
7. Moran MM, Xu H, Clapham DE. TRP ion channels in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2004;14(3):362-369. doi:10.1016/j.conb.2004.05.003
8. Montell C. Exciting trips for TRPs. *Nat Cell Biol.* 2004;6(8):690-692. doi:10.1038/ncb0804-690
9. Venkatachalam K, Luo J, Montell C. Evolutionarily Conserved, Multitasking TRP Channels: Lessons from Worms and Flies. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;223:937-962. doi:10.1007/978-3-319-05161-1\_9
10. Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B. Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:685-717. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406
11. Satheesh NJ, Uehara Y, Fedotova J, Pohanka M, Büsselberg D, Kruzliak P. TRPV currents and their role in the nociception and neuroplasticity. *Neuropeptides.* 2016;57:1-8. doi:10.1016/j.npep.2016.01.003
12. Meents JE, Fischer MJM, McNaughton PA. Agonist-induced sensitisation of the irritant receptor ion channel TRPA1. *J Physiol.* 2016;594(22):6643-6660. doi:10.1113/JP272237
13. Li H. TRP Channel Classification. *Adv Exp Med Biol.* 2017;976:1-8. doi:10.1007/978-94-024-1088-4\_1
14. Latorre R, Zaelzer C, Brauchi S. Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Q Rev Biophys.* 2009;42(3):201-246. doi:10.1017/S0033583509990072
15. Cenci C, Gould AP. Drosophila Grainyhead specifies late programmes of neural proliferation by regulating the mitotic activity and Hox-dependent apoptosis of neuroblasts. *Dev Camb Engl.* 2005;132(17):3835-3845. doi:10.1242/dev.01932
16. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389(6653):816-824. doi:10.1038/39807
17. Buckinx R, Van Nassauw L, Avula LR, Alpaerts K, Adriaensen D, Timmermans J-P. Transient receptor potential vanilloid type 1 channel (TRPV1) immunolocalization in the murine enteric nervous system is affected by the targeted C-terminal epitope of the applied antibody. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 2013;61(6):421-432.

doi:10.1369/0022155413484764

18. Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*. 2013;504(7478):113-118. doi:10.1038/nature12823
19. Goswami C, Hucho T. TRPV1 expression-dependent initiation and regulation of filopodia. *J Neurochem*. 2007;103(4):1319-1333. doi:https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04846.x
20. Christie S, Wittert GA, Li H, Page AJ. Involvement of TRPV1 Channels in Energy Homeostasis. *Front Endocrinol*. 2018;9. doi:10.3389/fendo.2018.00420
21. Ferrandiz-Huertas C, Mathivanan S, Wolf CJ, Devesa I, Ferrer-Montiel A. Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes*. 2014;4(3):525-564. doi:10.3390/membranes4030525
22. McGahon MK, Fernández JA, Dash DP, et al. TRPV2 Channels Contribute to Stretch-Activated Cation Currents and Myogenic Constriction in Retinal Arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(13):5637-5647. doi:10.1167/iovs.16-20279
23. Kambiz S, Duraku LS, Holstege JC, Hovius SER, Ruigrok TJH, Walbeehm ET. Thermo-sensitive TRP channels in peripheral nerve injury: a review of their role in cold intolerance. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS*. 2014;67(5):591-599. doi:10.1016/j.bjps.2013.12.014
24. Vay L, Gu C, McNaughton PA. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol*. 2012;165(4):787-801. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x
25. Hinman A, Chuang H, Bautista DM, Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(51):19564-19568. doi:10.1073/pnas.0609598103
26. Bandell M, Story GM, Hwang SW, et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*. 2004;41(6):849-857. doi:10.1016/s0896-6273(04)00150-3
27. McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 2002;416(6876):52-58. doi:10.1038/nature719
28. Ufret-Vincenty CA, Klein RM, Collins MD, Rosasco MG, Martinez GQ, Gordon SE. Mechanism for phosphoinositide selectivity and activation of TRPV1 ion channels. *J Gen Physiol*. 2015;145(5):431-442. doi:10.1085/jgp.201511354
29. Hu H-Z, Gu Q, Wang C, et al. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35741-35748. doi:10.1074/jbc.M404164200
30. Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. TRPV2 Is Activated by Cannabidiol and Mediates CGRP Release in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J Neurosci*. 2008;28(24):6231-6238. doi:10.1523/JNEUROSCI.0504-08.2008
31. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*. 2002;418(6894):181-186. doi:10.1038/nature00882
32. Smith PL, Maloney KN, Pothen RG, Clardy J, Clapham DE. Bisandrographolide from *Andrographis paniculata* activates TRPV4 channels. *J Biol Chem*. 2006;281(40):29897-29904. doi:10.1074/jbc.M605394200
33. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*. 2013;504(7478):107-112. doi:10.1038/nature12822
34. Hellmich UA, Gaudet R. Structural biology of TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*.

- 2014;223:963-990. doi:10.1007/978-3-319-05161-1\_10
35. Herrera E, Galindo R, Díaz IJ, Vargas L. Los canales TRP y su participación en la termotransducción. :11.
  36. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:619-647. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431
  37. Harteneck C, Plant T, Schultz G. From worm to man: Three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* 2000;23:159-166. doi:10.1016/S0166-2236(99)01532-5
  38. López-Romero AE, Hernández-Araiza I, Torres-Quiroz F, Tovar-Y-Romo LB, Islas LD, Rosenbaum T. TRP ion channels: Proteins with conformational flexibility. *Channels.* 2019;13(1):207-226. doi:10.1080/19336950.2019.1626793
  39. Hoenderop JGJ, Voets T, Hoefs S, et al. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J.* 2003;22(4):776-785. doi:10.1093/emboj/cdg080
  40. Ciardo MG, Ferrer-Montiel A. Lipids as central modulators of sensory TRP channels. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2017;1859(9, Part B):1615-1628. doi:10.1016/j.bbamem.2017.04.012
  41. Suh B-C, Hille B. PIP<sub>2</sub> is a necessary cofactor for ion channel function: How and why? *Annu Rev Biophys.* 2008;37:175-195. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125859
  42. Stansfeld PJ, Hopkinson R, Ashcroft FM, Sansom MSP. PIP<sub>2</sub>-Binding Site in Kir Channels: Definition by Multiscale Biomolecular Simulations. *Biochemistry.* 2009;48(46):10926-10933. doi:10.1021/bi9013193
  43. Gambhir A, Hangyás-Mihályné G, Zaitseva I, et al. Electrostatic Sequestration of PIP<sub>2</sub> on Phospholipid Membranes by Basic/Aromatic Regions of Proteins. *Biophys J.* 2004;86(4):2188-2207.
  44. Cohen MR, Moiseenkova-Bell VY. Structure of thermally activated TRP channels. *Curr Top Membr.* 2014;74:181-211. doi:10.1016/B978-0-12-800181-3.00007-5
  45. Rohacs T. Phosphoinositide regulation of TRP channels. *Handb Exp Pharmacol.* 2014;223:1143-1176. doi:10.1007/978-3-319-05161-1\_18
  46. Holendova B, Grycova L, Jirku M, Teisinger J. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> interacts with CaM binding domains on TRPM3 N-terminus. *Channels.* 2012;6(6):479-482. doi:10.4161/chan.22177
  47. Ju M, Shi J, Saleh SN, Albert AP, Large WA. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> interacts with PIP<sub>2</sub> to regulate activation of TRPC6/C7 channels by diacylglycerol in native vascular myocytes. *J Physiol.* 2010;588(9):1419-1433. doi:https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.185256
  48. Hansen SB, Tao X, MacKinnon R. Structural basis of PIP<sub>2</sub> activation of the classical inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2. *Nature.* 2011;477(7365):495-498. doi:10.1038/nature10370
  49. Nishida M, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. *EMBO J.* 2007;26(17):4005-4015. doi:10.1038/sj.emboj.7601828
  50. Zangerl-Plessl E-M, Lee S-J, Makshev G, et al. Atomistic basis of opening and conduction in mammalian inward rectifier potassium (Kir2.2) channels. *J Gen Physiol.* 2020;152(1). doi:10.1085/jgp.201912422
  51. Lopes CMB, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in Conserved Kir Channel-PIP<sub>2</sub> Interactions Underlie Channelopathies. *Neuron.* 2002;34(6):933-944. doi:10.1016/S0896-6273(02)00725-0
  52. Logothetis DE, Lupyan D, Rosenhouse-Dantsker A. Diverse Kir modulators act in close proximity to residues implicated in phosphoinositide binding. *J Physiol.* 2007;582(Pt 3):953-965. doi:10.1113/jphysiol.2007.133157

53. Baronas VA, Kurata HT. Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Front Physiol.* 2014;5. doi:10.3389/fphys.2014.00325
54. Poblete H, Oyarzún I, Olivero P, et al. Molecular Determinants of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) Binding to Transient Receptor Potential V1 (TRPV1) Channels. *J Biol Chem.* 2015;290(4):2086-2098. doi:10.1074/jbc.M114.613620
55. Xie L-H, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. *J Physiol.* 2008;586(Pt 7):1833-1848. doi:10.1113/jphysiol.2007.147868
56. González-Muñoz R, Bonache MA, Martín-Escura C, Gómez-Monterrey I. Recent Progress in TRPM8 Modulation: An Update. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11). doi:10.3390/ijms20112618
57. Liu L, Rohacs T. Regulation of the cold-sensing TRPM8 channels by phosphoinositides and Gq-coupled receptors. *Channels.* 2020;14(1):79-86. doi:10.1080/19336950.2020.1734266
58. Harraz OF, Longden TA, Hill-Eubanks D, Nelson MT. PIP<sub>2</sub> depletion promotes TRPV4 channel activity in mouse brain capillary endothelial cells. *eLife.* 2018;7. doi:10.7554/eLife.38689
59. Voets T, Janssens A, Droogmans G, Nilius B. Outer pore architecture of a Ca<sup>2+</sup>-selective TRP channel. *J Biol Chem.* 2004;279(15):15223-15230. doi:10.1074/jbc.M312076200
60. Lee SH, Chung GC, Jang JY, Ahn SJ, Zwiazek JJ. Overexpression of PIP<sub>2</sub>;5 Aquaporin Alleviates Effects of Low Root Temperature on Cell Hydraulic Conductivity and Growth in Arabidopsis1[W][OA]. *Plant Physiol.* 2012;159(1):479-488. doi:10.1104/pp.112.194506
61. McGoldrick LL, Singh AK, Demirkhanyan L, et al. Structure of the thermo-sensitive TRP channel TRP1 from the alga Chlamydomonas reinhardtii. *Nat Commun.* 2019;10(1):4180. doi:10.1038/s41467-019-12121-9
62. Goehring AS, Rivers DM, Sprague GF. Urmyletation: A Ubiquitin-like Pathway that Functions during Invasive Growth and Budding in Yeast. *Mol Biol Cell.* 2003;14(11):4329-4341. doi:10.1091/mbc.E03-02-0079
63. Yoon J, Ben-Ami HC, Hong YS, et al. Novel Mechanism of Massive Photoreceptor Degeneration Caused by Mutations in the trp Gene of Drosophila. *J Neurosci.* 2000;20(2):649-659. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-02-00649.2000
64. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235-242. doi:10.1093/nar/28.1.235
65. Gao Y, Cao E, Julius D, Cheng Y. TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature.* 2016;534(7607):347-351. doi:10.1038/nature17964
66. Yin Y, Wu M, Zubcevic L, Borschel WF, Lander GC, Lee S-Y. Structure of the cold- and menthol-sensing ion channel TRPM8. *Science.* 2018;359(6372):237-241. doi:10.1126/science.aan4325
67. Bai Y, Yu X, Chen H, et al. Structural basis for pharmacological modulation of the TRPC6 channel. *eLife.* 2020;9. doi:10.7554/eLife.53311
68. Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D370-376. doi:10.1093/nar/gkr703
69. Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Web Server issue):W665-W667. doi:10.1093/nar/gkh381
70. Enkavi G, Javanainen M, Kulig W, Róg T, Vattulainen I. Multiscale Simulations of Biological Membranes: The Challenge To Understand Biological Phenomena in a Living

- Substance. *Chem Rev.* 2019;119(9):5607-5774. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00538
71. Martínez L, Andrade R, Birgin EG, Martínez JM. PACKMOL: a package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *J Comput Chem.* 2009;30(13):2157-2164. doi:10.1002/jcc.21224
  72. Kmiecik S, Gront D, Kolinski M, Wieteska L, Dawid AE, Kolinski A. Coarse-Grained Protein Models and Their Applications. *Chem Rev.* 2016;116(14):7898-7936. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00163
  73. Machado MR, Pantano S. SIRAH tools: mapping, backmapping and visualization of coarse-grained models. *Bioinformatics.* 2016;32(10):1568-1570. doi:10.1093/bioinformatics/btw020
  74. Machado MR, Barrera EE, Klein F, Sónora M, Silva S, Pantano S. The SIRAH 2.0 Force Field: Altius, Fortius, Citius. *J Chem Theory Comput.* 2019;15(4):2719-2733. doi:10.1021/acs.jctc.9b00006
  75. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1):33-38, 27-28. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5
  76. Barrera EE, Machado MR, Pantano S. Fat SIRAH: Coarse-Grained Phospholipids To Explore Membrane-Protein Dynamics. *J Chem Theory Comput.* 2019;15(10):5674-5688. doi:10.1021/acs.jctc.9b00435
  77. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 2005;26(16):1701-1718. doi:10.1002/jcc.20291
  78. Goossens K, De Winter H. Molecular Dynamics Simulations of Membrane Proteins: An Overview. *J Chem Inf Model.* 2018;58(11):2193-2202. doi:10.1021/acs.jcim.8b00639
  79. Kohnke B, Kutzner C, Grubmüller H. A GPU-Accelerated Fast Multipole Method for GROMACS: Performance and Accuracy. *J Chem Theory Comput.* 2020;16(11):6938-6949. doi:10.1021/acs.jctc.0c00744
  80. Dalke A, Schulten K. Using Tcl for molecular visualization and analysis. *Pac Symp Biocomput Pac Symp Biocomput.* Published online 1997:85-96.
  81. Kalli AC, Wegener KL, Goult BT, Anthis NJ, Campbell ID, Sansom MSP. The Structure of the Talin/Integrin Complex at a Lipid Bilayer: An NMR and MD Simulation Study. *Struct England*1993. 2010;18(10):1280-1288. doi:10.1016/j.str.2010.07.012
  82. Barrett P, Hunter J, Miller JT, Hsu J-C, Greenfield P. matplotlib -- A Portable Python Plotting Package. In: ; 2005.
  83. Jacobs PA. Elements of Python3 Programming for Mechanical Engineers. :47.
  84. CASE DA, CHEATHAM TE, DARDEN T, et al. The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J Comput Chem.* 2005;26(16):1668-1688. doi:10.1002/jcc.20290
  85. Goddard TD, Huang CC, Meng EC, et al. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci Publ Protein Soc.* 2018;27(1):14-25. doi:10.1002/pro.3235
  86. Huang J, MacKerell AD. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem.* 2013;34(25):2135-2145. doi:10.1002/jcc.23354
  87. Acun B, Hardy DJ, Kale LV, Li K, Phillips JC, Stone JE. Scalable Molecular Dynamics with NAMD on the Summit System. *IBM J Res Dev.* 2018;62(6):1-9. doi:10.1147/jrd.2018.2888986
  88. Stajich JE. An Introduction to BioPerl. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2007;406:535-548. doi:10.1007/978-1-59745-535-0\_26
  89. Sievers F, Higgins DG. Clustal omega. *Curr Protoc Bioinforma.* 2014;48:3.13.1-16.

doi:10.1002/0471250953.bi0313s48

90. Stajich JE, Block D, Boulez K, et al. The Bioperl toolkit: Perl modules for the life sciences. *Genome Res.* 2002;12(10):1611-1618. doi:10.1101/gr.361602
91. Procter JB, Carstairs GM, Soares B, et al. Alignment of Biological Sequences with Jalview. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2021;2231:203-224. doi:10.1007/978-1-0716-1036-7\_13
92. Huffer KE, Aleksandrova AA, Jara-Oseguera A, Forrest LR, Swartz KJ. Global alignment and assessment of TRP channel transmembrane domain structures to explore functional mechanisms. Csanády L, Aldrich RW, Csanády L, Du J, Zubcevic L, eds. *eLife.* 2020;9:e58660. doi:10.7554/eLife.58660
93. Núñez-Vivanco G, Valdés-Jiménez A, Besoain F, Reyes-Parada M. Geomfinder: a multi-feature identifier of similar three-dimensional protein patterns: a ligand-independent approach. *J Cheminformatics.* 2016;8(1):19. doi:10.1186/s13321-016-0131-9
94. Palovcak E, Delemotte L, Klein ML, Carnevale V. Comparative sequence analysis suggests a conserved gating mechanism for TRP channels. *J Gen Physiol.* 2015;146(1):37-50. doi:10.1085/jgp.201411329
95. Poblete, H. (2013). Identificación del dominio dependiente de Fosfatidilinositol (4,5)-Bifosfato (PIP2) que activa el canal Receptor de Potencial Transitorio de Vaniloide tipo 1 (TRPV1) (Doctor). Universidad de Talca.
96. Itsuki, K., Imai, Y., Hase, H., Okamura, Y., Inoue, R., & Mori, M. X. (2014). PLC-mediated PI(4,5)P2 hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels. *The Journal of General Physiology*, 143(2), 183–201. doi:10.1085/jgp.201311033
97. Qiu, W., Fu, Z., Xu, G. G., Grassucci, R. A., Zhang, Y., Frank, J., ... Guo, Y. (2018). Structure and activity of lipid bilayer within a membrane-protein transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201812526. doi:10.1073/pnas.1812526115