

Títol del treball:

**Anàlisi bioinformàtic de les interaccions i selectivitat d'inhibidors
dels receptors Sigma 1 i Sigma 2**

Nom estudiant: Francesc Rispau Rustullet

Correu electrònic: rispau.cesc@gmail.com

Grau en: Biotecnologia

Nom del tutor: Ferran Feixas Gerones

Correu electrònic: ferran.feixas@udg.edu

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Receptor Sigma 1	1
1.2. Característiques estructurals	2
1.3. Característiques farmacòfor	4
1.4. Sigma 1 com a diana terapèutica.....	5
1.5. Receptor Sigma 2.....	7
1.6. Característiques estructurals	8
1.7. Característiques farmacòfor	9
1.8. Sigma 2 com a diana terapèutica.....	9
2. OBJECTIVES	10
3. METODOLOGIA	11
3.1. Selecció de PDBs de Sigma 1 i Sigma 2.....	11
3.2. Construcció de la llibreria de compostos	112
3.3. Preparació de les estructures pel docking molecular amb Chimera.....	14
3.4. Docking molecular.....	14
3.5. Anàlisi de resultats.....	14
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	16
4.1. Anàlisi de les Interaccions i orientació entre la llibreria d'inhibidors dels receptors de Sigma 1 i Sigma 2	16
4.2. Anàlisi de l'afinitat i selectivitat predita pels inhibidors de Sigma 1 i Sigma 2 en base a la mesura de grid score	24
5. CONCLUSIONS.....	27
6. BIBLIOGRAFIA	29

RESUM

Els receptors Sigma 1 (S1R) i Sigma 2 (S2R) són proteïnes implicades en diverses funcions com la regulació del calci intracel·lular, la regulació de l'estrès oxidatiu i la senyalització cel·lular, de manera que estan associats a patologies en les quals aquests processos biològics es troben alterats, com per exemple malalties neurodegeneratives i càncer. Per aquest motiu els receptors Sigma 1 i Sigma 2 són el focus principal de molts estudis i assajos biològics que tenen com a objectiu comprendre millor el funcionament a nivell molecular d'aquestes possibles dianes terapèutiques per desenvolupar nous tractaments. També és de gran importància l'estudi i el disseny de nous lligands que permetin regular aquests receptors i, per tant, poder ser utilitzats en el tractament de patologies. Un dels aspectes claus consisteix en el disseny d'inhibidors selectius per a cadascun dels receptors. Tot i els avenços dels últims anys, encara no es tenen inhibidors prou selectius per S1R i S2R.

L'objectiu d'aquest treball consisteix en aquest treball utilitzar i validar eines bioinformàtiques com el docking molecular per a estudiar els receptors Sigma 1 i Sigma 2 tant per les seves característiques estructurals com per la capacitat i selectivitat d'unió a lligands. Oferint una base sòlida de coneixement des d'una perspectiva emergent com és la bioinformàtica.

Per fer-ho s'han seleccionat 10 compostos amb activitat inhibidora coneguda per a cada un dels receptors i s'ha elaborat un docking amb les estructures cristal·logràfiques obtingudes a partir de la base de dades PDB, amb els codis 5HK1 per Sigma 1 i 7M95 per Sigma 2. D'aquesta manera es prediuen les interaccions i els valors d'afinitat que han permès l'estudi dels receptors i els lligands des del programa bioinformàtic Chimera i el programa Dock6 per realitzar el docking.

Els resultats han reafirmat la informació ja coneguda a nivell experimental i la importància dels residus Asp 126 i Glu172 de Sigma 1 i del residu Asp 29 en Sigma 2 per a la formació d'enllaços d'hidrogen amb els lligands. A més també han indicat que la majoria de compostos mostren una selectivitat elevada per Sigma 2 respecte Sigma 1. No obstant caldria fer una anàlisi més avançada per determinar les particularitats químiques i estructurals que causen aquesta preferència. Aquestes eines bioinformàtiques es poden utilitzar en un futur pel disseny de nous inhibidors selectius per aquests receptors.

RESUMEN

Los receptores Sigma 1 (S1R) y Sigma 2 (S2R) son proteínas implicadas en diversas funciones como la regulación del calcio intracelular, la regulación del estrés oxidativo y la señalización celular, de manera que están asociados a patologías en las cuales estos procesos biológicos se encuentran alterados, como por ejemplo enfermedades neurodegenerativas y cáncer. Por este motivo, los receptores Sigma 1 y Sigma 2 son el foco principal de muchos estudios y ensayos biológicos que tienen como objetivo comprender mejor el funcionamiento a nivel molecular de estas posibles dianas terapéuticas para desarrollar nuevos tratamientos. También es de gran importancia el estudio y el diseño de nuevos ligandos que permitan regular estos receptores y, por tanto, puedan ser utilizados en el tratamiento de patologías. Uno de los aspectos clave consiste en el diseño de inhibidores selectivos para cada uno de los receptores. A pesar de los avances de los últimos años, aún no se disponen de inhibidores suficientemente selectivos para S1R y S2R.

El objetivo de este trabajo consiste en utilizar y validar herramientas bioinformáticas como el docking molecular para estudiar los receptores Sigma 1 y Sigma 2 tanto por sus características estructurales como por la capacidad y selectividad de unión a ligandos, ofreciendo una base sólida de conocimiento desde una perspectiva emergente como es la bioinformática.

Para ello, se han seleccionado 10 compuestos con actividad inhibitoria conocida para cada uno de los receptores y se ha elaborado un docking con las estructuras cristalográficas obtenidas a partir de la base de datos PDB, con los códigos 5HK1 para Sigma 1 y 7M95 para Sigma 2. De esta manera se predicen las interacciones y los valores de afinidad que han permitido el estudio de los receptores y los ligandos desde el programa bioinformático Chimera y el programa Dock6 para realizar el docking.

Los resultados han reafirmado la información ya conocida a nivel experimental y la importancia de los residuos Asp 126 y Glu 172 de Sigma 1 y del residuo Asp 29 en Sigma 2 para la formación de enlaces de hidrógeno con los ligandos. Además, también han indicado que la mayoría de compuestos muestran una selectividad elevada por Sigma 2 respecto a Sigma 1. No obstante, sería necesario hacer un análisis más avanzado para determinar las particularidades químicas y estructurales que causan esta preferencia. Estas herramientas bioinformáticas se pueden utilizar en el futuro para el diseño de nuevos inhibidores selectivos para estos receptores.

ABSTRACT

Sigma 1 (S1R) and Sigma 2 (S2R) receptors are proteins involved in various functions such as intracellular calcium regulation, oxidative stress regulation, and cellular signalling, which are associated with pathologies where these biological processes are altered, such as neurodegenerative diseases and cancer. For this reason, Sigma 1 and Sigma 2 receptors are the main focus of many studies and biological assays aimed at better understanding the molecular functioning of these potential therapeutic targets to develop new treatments. Additionally, the study and design of new ligands that can regulate these receptors and therefore be used in the treatment of pathologies are of great importance. One key aspect is the design of selective inhibitors for each of the receptors. Despite the advances in recent years, there are still no sufficiently selective inhibitors for S1R and S2R.

The objective of this work is to use and validate bioinformatics tools such as molecular docking to study Sigma 1 and Sigma 2 receptors both for their structural characteristics and their binding capacity and selectivity for ligands, providing a solid knowledge base from an emerging perspective like bioinformatics.

To do this, 10 compounds with known inhibitory activity for each of the receptors have been selected and docking has been performed with the crystallographic structures obtained from the PDB database, with codes 5HK1 for Sigma 1 and 7M95 for Sigma 2. This way, the interactions and affinity values that allowed the study of the receptors and ligands from the bioinformatics program Chimera and the Dock6 program for docking are predicted.

The results have reaffirmed the information already known at the experimental level and the importance of residues Asp 126 and Glu 172 of Sigma 1 and residue Asp 29 in Sigma 2 for hydrogen bond formation with ligands. Additionally, they have indicated that most compounds show higher selectivity for Sigma 2 compared to Sigma 1. However, more advanced analysis is needed to determine the chemical and structural particularities that cause this preference. These bioinformatics tools can be used in the future for the design of new selective inhibitors for these receptors.

REFLEXIONS

REFLEXIÓ ÈTICA

El desenvolupament d'aquest treball de fi de grau sobre l'ús d'eines bioinformàtiques per a l'estudi dels receptors Sigma 1 i Sigma 2, planteja varies consideracions ètiques importants, per exemple la transparència referent als protocols computacional utilitzats. Els mètodes utilitzats garanteixen la validesa científica i la seva reproducció, de manera que s'evita la falsificació de dades o manipulació d'imatges ja que són resultats replicables. Un altre exemple que qualifica positivament l'ús de la bioinformàtica en quant a valors ètics, és la capacitat de predir el funcionament d'un fàrmac sense haver de recórrer a assajos preclínic i exposar a animals a patiment. Actualment però les eines bioinformàtiques no són prou precises per no necessitar de la validació experimental. Així doncs, si les eines bioinformàtiques com el docking molecular milloren la seva precisió serà possible realitzar assajos de fàrmacs i toxicitat de manera més ètica.

REFLEXIÓ DE SOSTENIBILITAT

Les eines bioinformàtiques no només ofereixen una extensa varietat de possibilitats per a l'estudi del comportament de les molècules i com interaccionen entre elles, sinó que a més permet fer-ho sense un impacte ambiental tan gran com el treball de laboratori. Si es requereix fer proves d'afinitat a un laboratori per molt insignificant que sigui la generació de residus, sempre es genera un consum de material o d'energia, en canvi en la bioinformàtica es poden dur a terme prediccions a partir de programes, que al no trobar-se limitat per preocupacions de contaminació o despeses també el fa més interessant per les possibilitats que ofereix. Tot i això, l'ús de servidors per fer els càlculs bioinformàtics també requereix energia, de manera que trobar la manera de fer aquestes simulacions més eficients també suposaria una millora respecte a la sostenibilitat.

REFLEXIÓ GÈNERE

En l'àmbit de la ciència cada vegada hi ha més consciència sobre els problemes de gènere i s'estan prenent iniciatives per promoure la igualtat i eliminar biaixos que desfavoreixen a les dones. Això també es veu reflectit a la bioinformàtica, la falta de referents femenines fomenta el síndrome de la impostora entre les dones en aquest àmbit. Tot i així cal fer nom i destacar a les contribucions de la Dra. Shoshana Wodak en la bioinformàtica, que va desenvolupar un algoritme d'acoblament per la predicció d'interaccions proteïna-proteïna aportant un gran valor a la ciència. Així doncs, queda un bon camí a recórrer per eliminar aquests estereotips que frenen gran part del potencial que podria contribuir en la bioinformàtica.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Receptor Sigma 1

El receptor Sigma 1 (S1R o $\sigma 1$) és una proteïna xaperona transmembrana formada per 223 aminoàcids involucrada en diverses funcions que involucren la interacció amb altres molècules, canals iònics i altres receptors proteics (Mishra et al., 2015).

Originalment va ser identificat com a un receptor de tipus opioide, degut a la seva capacitat d'unir-se a compostos opioïdes com la naxolona o naltrexona, però l'afinitat d'aquesta unió no és suficientment gran com per poder considerar-lo un receptor d'aquest tipus, per tant es va classificar com a receptor de tipus no opioide (Mishra et al., 2015).

Més concretament, la proteïna Sigma 1 està implicada en el transport de lípids i en la regulació de canals iònics com el de potassi, sodi o calci, i receptors N-metil-D-aspartat (NMDA), influint en la excitabilitat neuronal. A més modula la senyalització del calci i té capacitat d'unir-se a molècules psicoactives involucrades en els processos d'aprenentatge, memòria i estat d'ànim (*SIGMAR1 - Sigma non-opioid intracellular receptor 1 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt, s. f.*).

La sobreestimulació de receptors diana de Sigma 1, com per exemple NMDA, provoca una entrada en excés de Ca^{2+} contribuint en l'activació de processos de necrosi i apoptosi, per aquest motiu pot ser interessant l'ús de molècules inhibidores per a bloquejar S1R i evitar que formi complexos amb els receptors diana (Tchedre et al., 2008). També ha estat comprovat en rates femelles que el bloqueig de S1R produeix un efecte antihiperanalgèsic opioide durant la inflamació (*Sigma-1 receptors control immune-driven peripheral opioid analgesia during inflammation in mice | PNAS, s. f.*).

1.2. Característiques estructurals

El receptor Sigma 1 va ser clonat per primera vegada el 1996, i es va poder demostrar la seva similitud amb la isomerasa ERG2 i la presència d'un domini d'unió amb esteroides/esterols (Hanner et al., 1996).

S1R té una estructura trimèrica i cada una de les subunitats presenta 5 estructures hèlix- α (H1, H2, H3, H4, i H5), una d'elles transmembrana, i dues fulles- β on s'hi troba el domini d'unió amb el lligand; una zona altament conservada en seqüència entre espècies (Schmidt et al., 2016). Les fulles- β estan unides per forces no covalents formant un plegament de tipus "cupin fold", i disposades a un angle d'uns 30-40° entre elles formant una cavitat per al lligand.

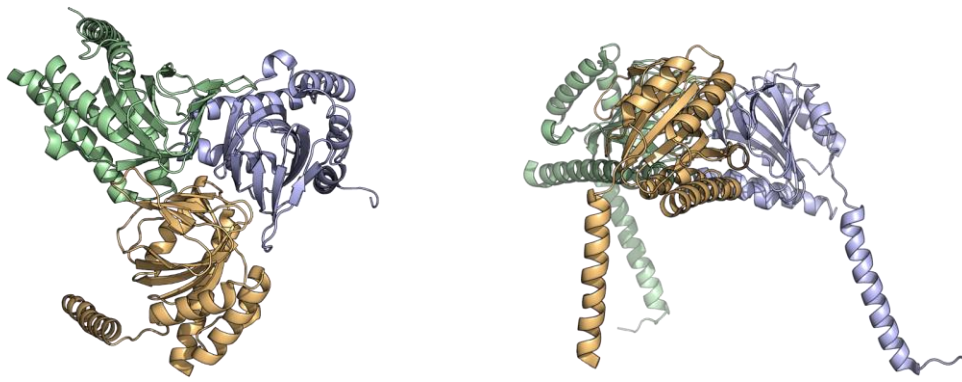


Figura 1. Estructura cristal·lina del receptor Sigma 1.

Mitjançant estudis experimentals i bioinformàtics s'ha demostrat que el segment transmembrana TM1 es troba entre els aminoàcids 8 i 34 mentre que el segment TM2 es troba entre els aminoàcids 83 i 111. També es coneix que els terminals N i C estan disposats al lumen del Reticle Endoplasmàtic (RE), l'N terminal el situem a l'esquerra abans del TM1 i el C terminal a la dreta posterior a H5 a la Figura 1. El primer conté uns 9 aminoàcids i és una seqüència de retenció en el RE, mentre que l'extrem terminal C està implicat en funcions de xaperona i en interaccions amb altres proteïnes. (Chu & Ruoho, 2016).

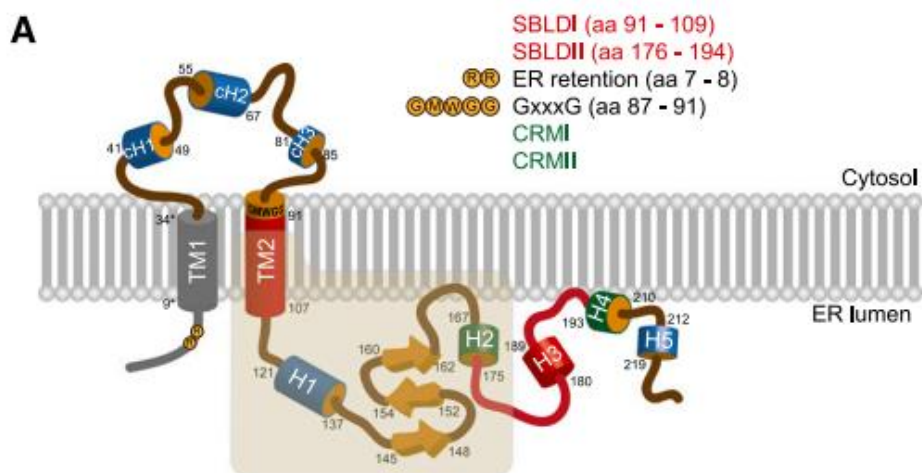


Figura 2. Representació del receptor Sigma 1 a la membrana del Reticle Endoplasmàtic. Imatge extreta de (Chu & Ruoho, 2016).

També podem observar la zona d'unió del lligand marcada amb groc a la Figura 2 on es mostren les hèlix- α (H1 i H2) i les fulles- β involucrades.

El que determina la funcionalitat de la proteïna Sigma 1 és la seva capacitat d'oligomerització. La S1R es pot trobar en diversos estats oligomèrics segons la unió amb lligands, fet que permet la seva interacció amb altres proteïnes i canals. Això es pot explicar pel fet que alguns lligands incrementen la capacitat de la S1R per formar dímers i altres estats oligomèrics, reduint la quantitat de monòmers que tenen la capacitat d'interaccionar amb receptors, canals i proteïnes, i per tant, disminuint la funcionalitat de la S1R (Mishra et al., 2015). A més, l'oligomerització està relacionada amb la funció dels extrems terminals N i C de la proteïna, els quals són essencials per la seva interacció amb altres proteïnes que permeten la posterior formació d'oligòmers. La configuració oligomèrica influeix en l'accessibilitat i l'afinitat d'aquests terminals per a establir connexions funcionals amb altres molècules cel·lulars, afectant així la capacitat de la S1R per participar en diverses vies de senyalització.

La oligomerització ve donada per canvis estructurals que provoca el lligand, permetent-nos diferenciar entre lligands que actuen com a agonistes i antagonistes. A partir d'anàlisis estructurals s'ha demostrat que els antagonistes promouen estats oligomèrics de S1R, adoptant una posició més lineal i amb el grup hidrofòbic del lligand apuntant a l'espai entre les hèlix- $\alpha 4$ i $\alpha 5$, mentre que els agonistes com el (+)-pentazocine apunten directament cap a la hèlix- $\alpha 4$ forçant un desplaçament que la allunya d' $\alpha 5$, alterant la capacitat d'unió amb altres monòmers de manera que S1R pot interaccionar amb altres proteïnes (Schmidt et al., 2018).

Per conèixer les bases de les característiques estructurals i moleculars de S1R, s'han fet estudis i assajos per identificar els residus crítics per la unió de lligands; Seth i col·laboradors (Seth et al.,

2001) van mutar diferents aminoàcids de S1R propis del domini d'unió amb el lligand per identificar la importància i el paper d'aquests, es va trobar que els residus D126 (aspartat) i E172 (glutamat) són indispensables per la unió del lligand, que al mutar-los els percentatges d'unió van baixar fins a un 9% i un 3% respectivament (pèrdua del 91% i 97% d'afinitat). Aquests resultats i aquesta informació a nivell molecular són de gran interès per al disseny de potencials lligands específics per a la modulació del receptor sigma 1.

Yamamoto H. va comprovar a partir assajos d'unió la importància del residu Y103 (tirosina) per la interacció que formen amb E172 (glutamat) i la interacció de l'anell de Y103 amb la zona hidrofòbica dels lligands coneguts de Sigma 1 com són [3H]NE-100 i [3H](+)pentazocine. A més els resultats indiquen que el segment entre els aminoàcids Ser99-Leu106 del domini transmembrana de S1R és una estructura determinant en la interacció receptor-lligand sense influir els nivells d'expressió de S1R (Yamamoto et al., 1999).

1.3. Característiques farmacòfor

El 2015 Glennon va proposar que per tal de que una molècula s'uneixi a S1R ha de presentar dos grups funcionals hidrofòbics units a un nitrogen central amb dos electrons lliures, aquest nitrogen hauria de ser un grup funcional de tipus N-alquil. A condicions fisiològiques, aquest N es troba protonat i, per tant, acumula càrrega positiva. A més una característica important és que els lligands amb formes dextrogir s'uneixen amb major afinitat que les levogir (Glennon, 2005).

Més endavant, el 2018 Hayden R Schmidt va estudiar la resposta de S1R humà davant diversos antagonistes i agonistes. Els antagonistes utilitzats van ser haloperidol i NE-100, i en els dos casos es va observar com el grup N carregat positivament formava una interacció electrostàtica amb el residu glutamat E172. En el cas dels agonistes no va hi haver un canvi significatiu, excepte per un petit canvi conformacional on la hèlix- α 4 s'allunyava de la hèlix- α 5 a causa de la posició que adopta el (+)-pentazocine. A més interacciona electrostàticament amb E172, de la mateixa manera que ho fan els antagonistes (Schmidt et al., 2018). Per aquest motiu, es va concloure que el farmacòfor d'aquests lligands inclouen el nitrogen alquilat carregat positivament i un grup hidrofòbic a cada banda. Tot i això, actualment es coneixen molt pocs inhibidors de Sigma 1 pel que és necessari un estudi més extens sobre les interaccions a nivell molecular.

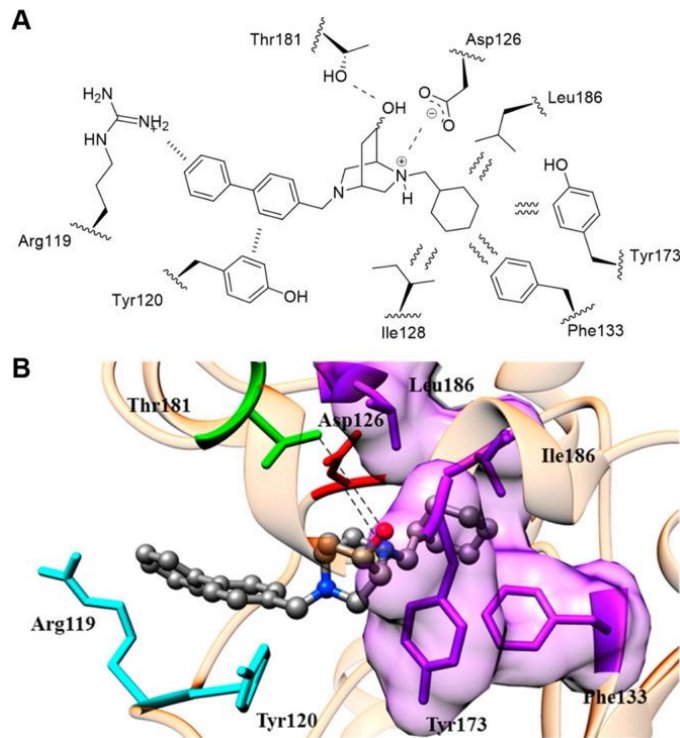


Figura 3. Representació en 2D i 3D del centre actiu i les interaccions entre un lligand i els residus del receptor S1R. Imatge extreta de (Fallica et al., 2021).

1.4. Sigma 1 com a diana terapèutica

Sigma 1 és una diana potencial terapèutica en el tractament de diversos trastorns i malalties en les que es veu involucrat. Un exemple és la neurodegeneració, que es caracteritza per la pèrdua progressiva de la funció neural i la mort de les neurones, resultant en malalties com l'Alzheimer, el Parkinson i l'ELA. En aquest context S1R pot actuar regulant la homeòstasi de calci interaccionant amb proteïnes i receptors com el IP3R i modular la senyalització mitocondrial, promovent la producció d'ATP i per tant millorant la supervivència cel·lular. A més al ser activat es pot inhibir la sobreestimulació dels receptors NMDA frenant l'excitotoxicitat (Hayashi et al., 2011). En estudis preclínic s'ha comprovat la eficiència neuroprotectora de lligands de S1R per la modulació del calci (Klette et al., 1995).

S1R també té un paper important en els trastorns psiquiàtrics degut a la seva capacitat per regular la neurotransmissió. Estímuls com l'estrès oxidatiu, la inflamació, alteracions en la homeòstasi del calci i l'expressió anormal de proteïnes poden conduir a l'estrès del reticle endoplasmàtic provocant malalties neuropsiquiàtriques (Hashimoto, 2015).

En estat latent S1R forma un complex amb la proteïna BiP, impeding l'activitat xaperona de S1R. En presència d'un agonista o davant l'esgotament de calci al RE es dissocia aquest complex permetent

l'activitat xaperona (Hayashi & Su, 2007). Aleshores l'activació de la xaperona del receptor Sigma 1 per acció d'agonistes podria produir efectes neuroprotectors davant malalties neuropsiquiàtriques.

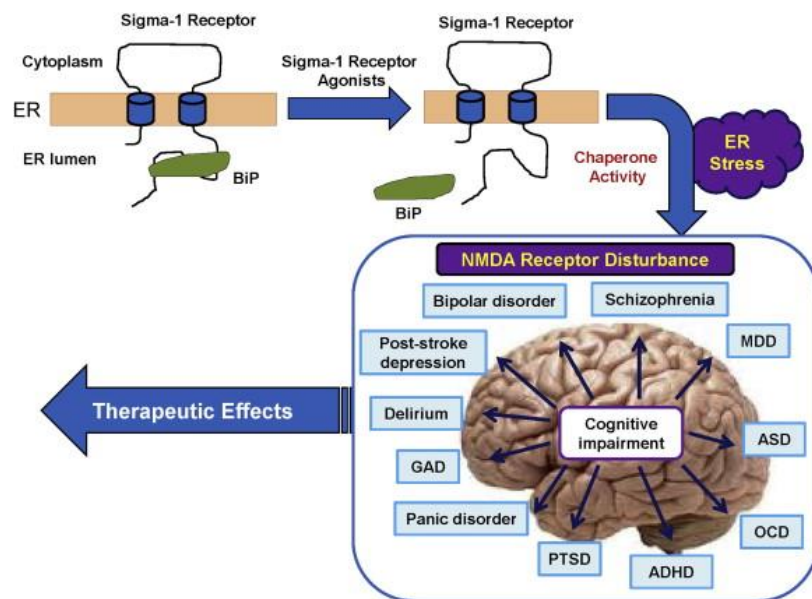


Figura 4. Esquema del mecanisme i conseqüències de la dissociació de la proteïna BiP de S1R davant un agonista. Al activar-se l'activitat xaperona augmenta l'estrès del reticle endoplasmàtic causant les irregularitats en el funcionament del cervell que es mostren a l'esquema. Imatge extreta de (Hashimoto, 2015).

La capacitat d'S1R per modular l'apoptosi, la proliferació, la supervivència cel·lular i l'angiogènesi fa que sigui una diana terapèutica potencial per al càncer. Sembla que existeixen antagonistes que poden induir l'apoptosi en cèl·lules tumorals i cèl·lules endotelials microvasculars, elevant els nivells intracel·lulars de calci i seguit per una activació de rutes apoptòtiques i la inhibició de la via PKB/Akt vinculada amb la supervivència cel·lular. Això ha estat comprovat en cèl·lules dependents de S1R per utilitzar les vies promotores de la supervivència, en canvi les que no ho són (com per exemple les cèl·lules epitelials mamàries humanes i fibroblasts dèrmics) són resistents als antagonistes inhibidors (Spruce et al., 2004).

A un estudi de 95 pacients amb càncer de mama primari es va confirmar una relació significativa de S1R amb la esterol isomerasa humana hSI i que s'associa amb els gens BCL2 de la proteïna antiapoptòtica de leucèmia 2, resultant que els pacients amb major expressió de S1R van presentar una menor supervivència (Simony-Lafontaine et al., 2000). Es sap que S1R és una potencial diana terapèutica especialment per al càncer de mama TNBC, i l'ús d'antagonistes ajuden disminuint l'activitat d'Akt, provocant la disrupció de l'homeòstasi del calci i suprimint la capacitat de la cèl·lula per gestionar l'estrès del RE. Per tots aquests motius és necessari entendre millor com funciona a nivell molecular el receptor Sigma 1 per tal de poder dissenyar inhibidors més potents i selectius.

1.5. Receptor Sigma 2

Sigma 2 (S2R o σ_2) és un receptor transmembrana de quatre dominis present a cèl·lules susceptibles a la degeneració com per exemple les neurones. Això comporta que S2R tingui un paper important en malalties com l'Alzheimer, el Parkinson i la Demència.

Va ser descobert el 1990 per perfils farmacològics de línies cel·lulars canceroses PC12 i de cervell de cobaia (Hellewell & Bowen, 1990), on es va observar que tenien una gran afinitat per el DTG i haloperidol, però sense afinitat per els (+)-benzomorfans, plantejant la possibilitat de diversos tipus de receptors sigma més enllà del Sigma 1. A més es va poder determinar un pes molecular de 18 a 22kDa per aquest nou receptor Sigma 2, però no va ser fins el 2017 que es va conèixer el gen que el codifica (TMEM97) (Alon et al., 2017).

El receptor Sigma 2 és diferent al receptor Sigma 1 però comparteix característiques farmacològiques, similituds estructurals a nivell local referent al lloc on s'uneixen els agonistes i antagonistes i actua funcionalment de la mateixa manera interaccionant amb altres proteïnes receptores. Pel que fa a la localització, el trobem al reticle endoplasmàtic i als lisosomes. Entre les possibles funcions conegudes es sap que forma un complex ternari amb PGRMC1 a la membrana plasmàtica incrementant la internalització del colesterol LDLR. A més a més, es coneix que és responsable de disminuir la disponibilitat cel·lular del transportador lisosomal d'esterols NPC1, controlant el transport lipídic de colesterol i LBPA. Sigma 2 també interactua amb les proteïnes de membrana EGFR modulant els senyals posteriors com les quinases PKC i la RAF que regulen la proliferació i transcripció cel·lular (Lizama et al., 2023).

Hi ha evidències de que pot interactuar amb canals iònics per mobilitzar ions com el Ca^{2+} i K^+ , de la mateixa manera que el receptor Sigma 1. Tot i això, és un receptor molt menys estudiat que Sigma 1, per tant, queda molt camí per recórrer en quan a entendre la funcionalitat d'aquest receptor proteic.

1.6. Característiques estructurals

A diferència de Sigma 1, Sigma 2 està format per quatre dominis hèlix- α transmembrana i s'associen en dímers. Estan organitzades de manera que formen una cavitat d'unió al lligand al centre de la proteïna (Alon et al., 2021).

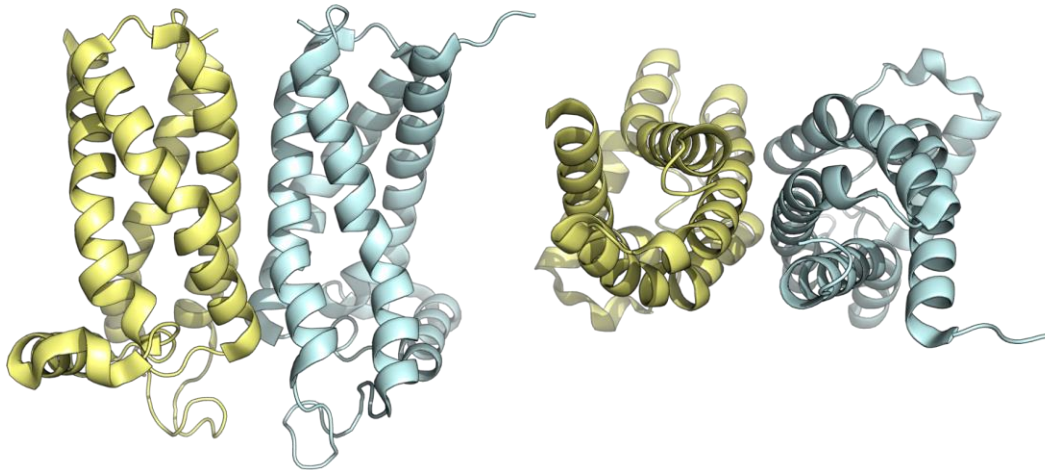


Figura 5. Estructura receptor Sigma 2.

A un estudi recent es va comprovar que TMEM97 és el gen codificant per Sigma 2; els anàlisis consistien en assajos d'afinitat utilitzant lligands coneguts per a S2R comprovant la unió amb TMEM97 i viceversa. D'aquesta manera es va observar que comparteixen les característiques estructurals. Posteriorment es van realitzar estudis de mutagènesi dirigida per als residus glutamat i aspartat de tota la proteïna ja que es sospitava de que un dels dos actuava de contraió que manté la neutralitat del lloc d'unió al tenir en compte l'amina protonada que presenten tots els lligands de Sigma 2. Els resultats van mostrar que els residus Asp29 i Asp56 són essencials per a la unió del lligand, amb un rol similar al de Glu172 i Asp126 en Sigma 1 formant una xarxa d'enllaços, on Asp29 presenta una interacció directe amb el lligand i Asp 56 té un paper per al plegament proteic de Sigma 2 a la conformació adequada.

El mateix grup d'investigadors va poder comprovar, a partir de dos lligands d'alta afinitat, interaccions d'enllaços d'hidrogen entre Val146 i Gln77 i una molècula d'aigua coordinada per His21, Tyr103 i Gln77 són essencials per la unió amb alta afinitat dels lligands (Alon et al., 2017).

1.7. Característiques farmacòfor

La cavitat d'unió al lligand de S2R està envoltada amb residus hidrofòbics i aromàtics, facilitant la inserció de lligands en la seva forma neutra i desprotonada i un cop s'acosten a la regió on hi ha l'Asp29 es protonen (Alon et al., 2021). Aquestes característiques estructurals permeten que el lloc d'unió del S2R sigui compatible amb compostos que presenten afinitat per aquestes propietats, que són similars a les que tenen els lligands de S1R, tot i així també hi ha distincions.

Una de les característiques és la hidrofobicitat del lligand, que permet establir-lo a partir d'interaccions amb els residus hidrofòbics de la cavitat d'unió (Leu i Ile). També cal que presenti anells aromàtics per facilitar les interaccions π - π amb residus Tyr, Phe i Trp.

A diferència dels lligands del S1R, els del S2R tendeixen a tenir un major volum molecular per ocupar la cavitat d'unió, a més la inserció d'anells aromàtics als lligands afecta de forma diferent a l'afinitat en cada un dels receptors; s'ha demostrat que en S1R baixa l'afinitat mentre que en S2R acostuma a millorar aquests valors (Fallica et al., 2021).

1.8. Sigma 2 com a diana terapèutica

S'han fet estudis evidenciant la relació del receptor Sigma 2 té una amb el càncer i la possibilitat d'utilitzar-lo com a diana terapèutica. A un d'ells es va fer un knockdown de S2R a una línia cel·lular epitelial immortalitzada i els resultats van mostrar que la expressió de NGAL va quedar bloquejada. NGAL actua segregant a la proteïna MMP9 protegint-la de la degradació, permetent la supervivència tumoral. Aleshores al reduir la quantitat de S2R a les cèl·lules de càncer, disminueix la expressió de NGAL i conseqüentment la activitat de MMP, inhibint la progressió del càncer (Mir et al., 2012).

Es coneixen lligands selectius de S2R que regulen el creixement de les cèl·lules tumorals. Es creu que els antagonistes promouen la supervivència d'aquestes cèl·lules tumorals mentre que els agonistes indueixen l'apoptosi inhibint la proliferació. Això es va poder demostrar en un estudi on es van utilitzar diferents lligands per a S2R (haloperidol, DTG, (+) i (-)-pentazocina, rimcazol, etc.) en cèl·lules tumorals derivades adenocarcinoma mamari humà, i els resultats van mostrar alts percentatges d'inhibició a concentracions altes de lligand, especialment el rimcazol que va arribar a inhibir més d'un 60% de la proliferació cel·lular (Brent & Pang, 1995).

Els mecanismes pels quals S2R està implicat en l'apoptosi són diferents segons els lligands que s'hi uneixen, per exemple els lligands WC26, SV119 i RHM-138 indueixen la fragmentació del ADN,

l'activació de la caspasa-3 i la escissió de PARP-1, alhora disminuint l'activitat de la via mTOR (Zeng et al., 2012). En canvi, en un altre estudi, es va estudiar l'efecte del lligand SW43 com a tractament en cèl·lules de pàncrees i es va comprovar l'activació d'un procés independent de caspasa que involucra la permeabilització de la membrana lisosomal i l'estrès oxidatiu cel·lular (Hornick et al., 2012).

Degut al diferent paper que tenen Sigma 1 i Sigma 2 a nivell cel·lular és rellevant identificar nous inhibidors selectius per a les dues proteïnes. Tot i això, actualment es coneixen molt pocs inhibidors selectius per aquestes proteïnes. Per tant, és necessari adquirir coneixement a nivell molecular d'aquests receptors i d'inhibidors coneguts per obrir les portes a la cerca de noves molècules amb activitat farmacològica.

2. OBJECTIVES

Sigma 1 and Sigma 2 receptors play a key role in several biological processes and are involved in several diseases. Despite playing similar roles and displaying similar binding site residues they present significant differences in terms of global structure and are involved in different cellular processes. In the last year, several inhibitors have been designed to regulate the activity of these receptors. Ideally, these inhibitors should be selective toward a particular receptor. However, most of the inhibitors proposed up to now present low selective and are not able to discriminate between Sigma 1 and Sigma 2 receptors. Exploring the interactions between known inhibitors at the molecular level can help in the identification of new inhibitors that show enhanced selectivity.

The principal aim of this research project is to understand in more detail the interactions between Sigma 1 and Sigma 2 inhibitors and their respective receptors. To this end, bioinformatics and computational tools such as Chimera will be used to identify and characterize Sigma 1 and Sigma 2 receptor structures, defining the key characteristics that enable ligand binding. Additionally, molecular docking calculations will be performed to predict drug-receptor interactions and the use of these tools will be validated against experimental structures.

An important aspect is to compare the amino acids comprising the binding site of the structures of the Sigma 1 and Sigma 2 receptors to analyse the similarities and differences that explain their function and affinity for certain molecules with the aim of determining the physicochemical attributes of the ligands that favour the interaction with the receptor. This analysis will offer valuable information for the rational design of selective drugs targeting these receptors.

As specific objectives, we also aim to use molecular docking calculations to explore the selectivity of the two receptors with a library of known inhibitors. This evaluation will be carried out by cross-evaluating their natural ligands to assess their binding capacity and affinity for S1R and S2R.

Finally, by discussing the potential biological implications, this research aims to contribute to a deeper understanding of Sigma 1 and Sigma 2 receptors and its role in therapeutic applications.

3. METODOLOGIA

En el següent apartat s'exposa la metodologia utilitzada durant aquest treball. Per tal de fer els càlculs reproduïbles es proporciona tota la informació sobre els codis PDB utilitzats, així com els codis ZINC i PubChem dels lligands i el protocol per realitzar el docking molecular.

3.1. Selecció de PDBs de Sigma 1 i Sigma 2

Per a estudiar la interacció entre els inhibidors de Sigma 1 i Sigma 2 i els corresponents receptors s'han seleccionat les següents estructures cristal·lines al Protein Data Bank (PDB):

Receptor Sigma 1: Codi PDB 5HK1 amb una resolució de 2.50 Å. D'origen humà, conté el lligand 61W (veure més avall). A més del PDB 5HK1 amb el lligand 61W, també s'ha cristal·litzat el receptor Sigma 1 en presència de 4-IBP (5HK2 resolució 3.2 Å), haloperidol (6DJZ resolució 3.08 Å), NE-100 (6DK0 resolució de 2.9 Å) i (+)-pentazocine (6DK1 resolució 3.12 Å). S'ha escollit el PDB 5HK1 ja que és el que presenta una major resolució això assegura una fiabilitat més alta referent a la orientació de les cadenes laterals i esquelet de la proteïna.

Receptor Sigma 2: Codi PDB 7M95 amb una resolució de 2.41 Å. D'origen boví, conté el lligand ZNC (veure més avall). A més del PDB 7M95 amb el lligand ZNC, també s'ha cristal·litzat el receptor Sigma 2 en presència de PB28 (7M93 resolució 2.94 Å), roluperidone (7M94 resolució 3.08 Å), Z4857158944 (7M96 resolució de 2.41 Å) i colesterol (7MFI resolució 2.81 Å). Com en el cas anterior s'ha escollit el PDB 7M95 ja que és el que presenta una major resolució.

Degut a que encara no s'ha pogut obtenir una estructura cristal·litzada del Receptor Sigma 2 de l'espècie *Homo sapiens*, s'ha optat per seleccionar la més similar disponible, de l'espècie *Bos taurus*.

Aquests dos complexos proteïna-inhibidor s'utilitzaran com a referència per a determinar quins aminoàcids tenen un paper rellevant per interaccionar amb l'inhibidor i per realitzar una validació dels protocols de docking molecular que s'utilitzaran en aquest treball.

A més a més, dels inhibidors de Sigma 1 i Sigma 2 coneguts a la bibliografia (veure següent apartat). Els lligands ja presents en la estructura cristal·litzada (61W i ZNC) dels receptors s'utilitzaran com a referència per a la construcció de la llibreria de compostos.

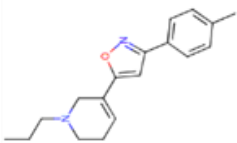
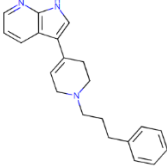
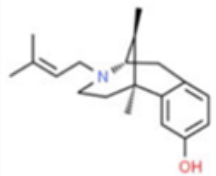
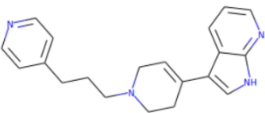
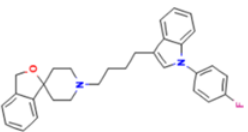
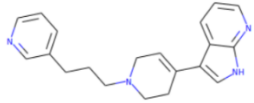
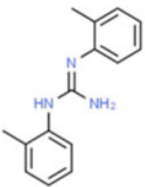
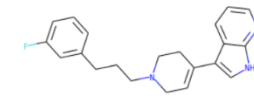
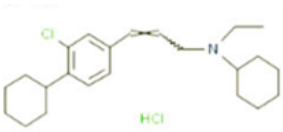
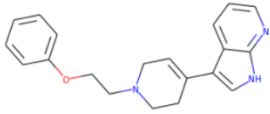
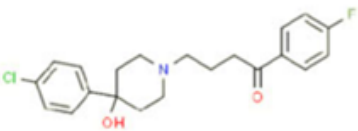
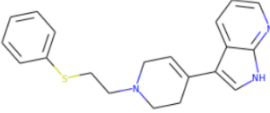
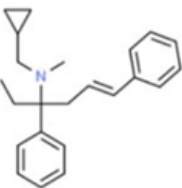
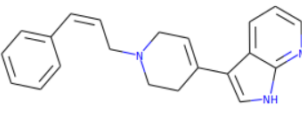
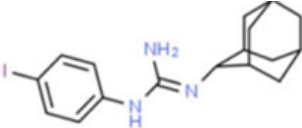
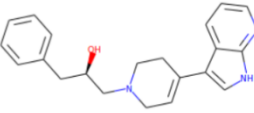
3.2. Construcció de la llibreria de compostos

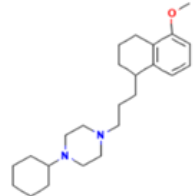
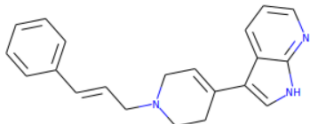
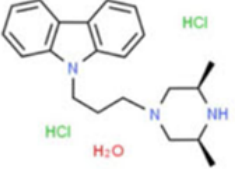
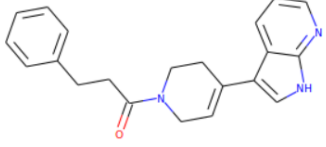
Un cop validats el procés de docking molecular per els compostos dels quals es coneix l'estructura cristal·logràfica, es realitzarà un estudi més extens utilitzant una llibreria de compostos d'inhibidors de Sigma 1 i Sigma 2. Per construir la llibreria de compostos s'han seleccionat 10 lligands potencials de cada receptor, inclòs el que ja porten a la seva estructura cristal·logràfica.

Les molècules escollides per construir la llibreria per a Sigma 1 s'han obtingut d'un recull de l'article "*Small-Molecule Modulators of Sigma1 and Sigma2/TMEM97 in the Context of Cancer: Foundational Concepts and Emerging Themes*" (Oyer et al., 2019). El criteri de selecció ha estat en base a l'alta afinitat amb evidència experimental que presenten aquests compostos amb S1R. L'estructura i el codi PubChem d'aquests compostos es pot trobar a la Taula 1.

Actualment es coneixen menys inhibidors del receptor Sigma 2 que de Sigma 1. El lligand ZNC co-cristal·litzat al PDB 7M95 és el que presenta una major selectivitat per aquest receptor. Per aquest motiu, els lligands per al receptor Sigma 2 que completen la llibreria s'han seleccionat per ser anàlegs de la molècula ZNC ja present a l'estructura cristal·lina 7M95, identificats a partir de la base de dades ZINC segons similitud estructural alta. D'aquesta manera s'han obtingut 9 compostos més amb una activitat potencialment similar i possibles propietats farmacològiques per a S2R. L'estructura i codi ZINC d'aquests compostos es pot trobar a la Taula 1.

Taula 1. Llibreria de compostos seleccionats per Sigma 1 i Sigma 2.

<u>Compost (S1R)</u>	<u>Estructura</u>	<u>Compost (S2R)</u>	<u>Estructura</u>
61W		ZNC	
(+)-pentazocine (441278)		ZINC000347264863	
Siramesine (9829526)		ZINC000929867220	
SR31747A (7847471)		ZINC000490007864	
DTG (54726191)		ZINC000196811925	
Haloperidol (3559)		ZINC000533478965	
Igmesine (6438340)		ZINC000506629258	
IPAG (4239764)		ZINC000290077738	

<p>PB28 (10474335)</p>		<p>ZINC000506629255</p>	
<p>Rimcazol (53389)</p>		<p>ZINC000055553132</p>	

3.3. Preparació de les estructures pel docking molecular amb Chimera

S'ha utilitzat el programa USCF Chimera (versió 1.17.3) per preparar les estructures dels receptors S1R i S2R (5HK1 i 7M95 respectivament) i per al docking molecular. Les estructures cristal·logràfiques dels receptor no mostren els àtoms d'hidrogen, de manera que és necessari afegir aquests àtoms per tal de tenir una estructura completa. Per altra banda, per tal de dirigir el docking molecular cap a una regió concreta cal preparar el lligand unit al receptor per delimitar la zona a on és possible realitzar el docking. Els passos per preparar el receptors Sigma 1 (PDB 5HK1) i Sigma 2 (PDB 7M95) són els següents:

1. Per preparar el receptor, en primer lloc s'eliminen tots els lligands, les molècules d'aigua i els residus catalogats com a “*nonstandard*” de les estructures cristal·lines (fitxers PDB), ja que aquestes molècules no contribueixen a la interacció dels receptors amb els lligands i poden influir en el procés de docking.
2. Seguidament s'utilitza la funció del Chimera anomenada “*Dock Prep*” per tal de reconstruir els àtoms de la proteïna que puguin faltar al PDB, afegir els hidrògens a l'estructura i assignar una càrrega atòmica a cada àtom del receptor. Un cop fet aquest pas, es genera un fitxer en format mol2 que s'utilitzarà per realitzar el càlcul de docking.
3. Finalment, s'eliminen els hidrògens afegits anteriorment i es genera la superfície del receptor. Aquesta superfície s'utilitza com a referència per orientar els lligands en diferents posicions. Per aquest motiu es genera l'arxiu “*rec.dms*”, necessari també per al procés de docking.

Un cop els dos receptors estan preparats pel docking molecular, es continua amb els lligands co-cristal·litzats amb les proteïnes:

1. En el cas dels lligands 61W i ZNC (ja presents en les estructures cristal·lines), cal un pas previ per aïllar-los dels receptors i altres molècules amb l'objectiu d'utilitzar-los com a indicador per delimitar la zona d'interacció a on es realitzarà el docking molecular.
2. Un cop es tenen els lligands 61W i ZNC aïllats s'utilitza el protocol "*Dock Prep*" per cada un. Aquest procés afegeix hidrògens i assigna una càrrega atòmica a tots els àtoms de la molècula. Al final del procés, es genera un fitxer mol2 que conté les coordenades del lligand i indica la regió d'interès per realitzar el docking molecular.

Finalment, es prepara la llibreria de compostos manualment i es genera el fitxer per realitzar el docking molecular de tots els compostos que componen la llibreria.

1. Cada lligand s'obre amb el Chimera i es prepara pel docking molecular utilitzant l'eina "*Dock Prep*". Seguidament es genera un fitxer mol2 per a cada lligand.
2. Els arxius obtinguts dels lligands individualment de cada receptor s'agrupen a un mateix fitxer, de manera que un fitxer conté els lligands de Sigma 1 i l'altre els de Sigma 2.

3.4. Docking molecular

El docking molecular proporciona la interacció i l'afinitat entre els receptors Sigma 1 i Sigma 2 amb els lligands seleccionats en la llibreria de compostos, com major sigui la interacció, major és la afinitat aleshores millor candidat és aquell lligand.

El docking s'ha realitzat amb el programa Dock6, instal·lat al servidor virtual de Linux (VM Oracle), de manera que les ordres informàtiques s'han fet a través de la Terminal d'aquest servidor.

Prèviament s'han hagut de transferir els arxius necessaris; 6 són arxius genèrics requerits per al procés de docking (box.in, grid.in, rigid.in INSPH, show.in i dock.run), i 4 de variables segons els lligands i receptors utilitzats: rec.dms (corresponent a la superfície del receptor), rec_charged.mol2 (estructura atòmica del receptor), ligand.mol2 (estructura del lligand) i ZINC_results.mol2 (llibreria de lligands).

Els resultats del docking corresponen a una llista ordenada dels compostos segons un valor d'energia d'interacció (*Grid score*) que es pot descompondre entre un terme electrostàtic i de van der Waals.

3.5. Anàlisi de resultats

Per als resultats s'han tingut en compte diverses aspectes a avaluar. Per una banda, s'ha considerat important l'anàlisi dels enllaços d'hidrogen entre els lligands i els receptors, per tal de conèixer quins residus de la proteïna són els més freqüents al determinar aquesta interacció i per tant més importants per aquest tipus d'interaccions amb el lligand. També es valoraran la posicions i orientacions que adoptin els lligands al lloc d'unió dels receptor Sigma 1 i Sigma 2.

En primer lloc, es validarà la precisió del docking comparant les posicions que adopten els lligands naturals (61W per S1R i ZNC per S2R) de cada receptor en l'estructura cristal·lina amb les posicions dels mateixos lligands posterior al docking.

En segon lloc, es farà una comparativa més extensa amb les diferents llibreries de lligands a través del seu valor d'energia d'interacció. Per aquest motiu, s'examinarà el “*grid score*”, un indicador d'afinitat que s'utilitzarà per comparar l'efectivitat dels lligands en els diferents receptors.

Finalment, per tal d'avaluar la selectivitat dels diferents lligands es farà la diferència entre l'afinitat mostrada per Sigma 1 i per Sigma 2. Al ser els “*grid scores*” majoritàriament negatius, una diferència positiva indicarà selectivitat cap a Sigma 2 mentre que una diferència negativa mostrarà selectivitat cap a Sigma 1.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Aquest treball es focalitza en estudiar la interacció i selectivitat d'un seguit d'inhibidors coneguts dels receptors Sigma 1 i Sigma 2 amb el lloc d'unió d'aquests receptors. Per aconseguir-ho, s'ha treballat amb dues llibreries de compostos diferenciades (veure Taula 1, metodologia): 1) 10 inhibidors coneguts del receptor Sigma 1; 2) 10 inhibidors coneguts del receptor Sigma 2. Amb aquestes dues llibreries s'han realitzat càlculs de docking molecular amb els receptors corresponents, per tal d'avaluar l'orientació, interaccions i afinitat dels inhibidors coneguts pel receptor que mostren activitat experimental. Tot i això, també s'ha realitzat el docking per a l'altre receptor per tal d'avaluar-ne la selectivitat.

En base a això, aquest apartat de resultats es divideix en els següents apartats. En primer lloc, s'estudiarà la interacció a nivells d'enllaços d'hidrogen entre els lligands de la llibreria d'inhibidors coneguts per S1R i S2R als PDBs 5HK1 i 7M95, respectivament. Seguidament, es compararà l'orientació predita pels inhibidors 61W i ZNC en càlculs de docking molecular contra la seva orientació als PDBs originals 5HK1 i 7M95. Finalment, es realitzaran docking moleculars per una llibreria de compostos amb activitat inhibidòria coneguda per Sigma 1 i Sigma 2 i també pel receptor que mostra menys activitat i s'analitzarà quina afinitat mostren per a cada un dels receptors per tal de discutir-ne la selectivitat. Per tal de facilitar la discussió dels resultats, aquests es discutiran a mesura que els resultats es vagin presentant.

4.1. Anàlisi de les Interaccions i orientació entre la llibreria d'inhibidors dels receptors de Sigma 1 i Sigma 2

En primer lloc, s'ha realitzat el docking molecular per la llibreria de compostos dels inhibidors de Sigma 1 i el receptor Sigma 1 utilitzant el PDB 5HK1. En segon lloc, s'ha realitzat el docking

molecular per la llibreria d'inhibidors de Sigma 2 i el receptor Sigma 2 utilitzant el PDB 7M95. Seguidament, s'ha fet el docking molecular amb els inhibidors i receptors creuats. Per a aquests dockings s'han col·leccionat: 1) el nombre d'enllaços d'hidrogen, 2) l'orientació i 3) l'afinitat (*grid score*). En primer lloc, es mostra l'anàlisi del nombre i tipus d'enllaços d'hidrogen predits pels diferents compostos en els càlculs de docking molecular. Aquests resultats es mostren a les Taules 2, 3 i 4.

Taula 2. Informació sobre els enllaços d'hidrogen establerts entre el receptor Sigma 1 i cada un dels compostos de Sigma 1 segons els càlculs de docking molecular.

<u>Compost</u>	<u>n° Enllaços</u>	<u>Enllaç d'hidrogen</u> <u>(Donador/Acceptor/Hidrogen)</u>	<u>Distància (Donador- Acceptor, Acceptor- Hidrogen, Å)</u>
61W	1	61W 1 N04 - GLU 165.A OE2 - 61W 1 H04	3.195 2.279
53389	1	LIG 1 N2 - ASP 119.A OD2 - LIG 1 H9	2.799 2.066
3559	0	-	-
7847471	0	-	-
54726191	1	LIG 1 N3 - TYR 113.A OH - LIG 1 H14	3.290 2.452
6438340	0		
4239764	1	LIG 1 N1 - GLU 165.A OE1 - LIG 1 HN	2.656 1.904
441278	0	-	-
10474335	2	LIG 1 N1 - TYR 113.A OH - LIG 1 HN	2.703 1.742
		LIG 1 N2 - GLU 165.A OE1 - LIG 1 HN1	2.865 1.957
9829526	1	LIG 1 N1 - GLU 165.A OE2 - LIG 1 HN	2.916 1.950

Taula 3. Informació sobre els enllaços d'hidrogen establerts entre el receptor Sigma 2 i cada un dels compostos de Sigma 2 segons el docking molecular.

<u>Compost</u>	<u>n° Enllaços</u>	<u>Enllaç d'hidrogen</u> <u>(Donador/Aceptor/Hidrogen)</u>	<u>Distància (Donador-Aceptor, Aceptor-Hidrogen, Å)</u>
ZINC000533480491	2	GLN 73.A NE2 - ZNC 1 N2 - GLN 73.A HE21	3.367 2.447
		ZNC 1 N - ASP 25.A OD1 - ZNC 1 HN	2.844 1.917
ZINC000929867220	1	ZIN 1 N6 - ASP 25.A OD1- ZIN 1 H7	2.834 1.901
ZINC000347264863	1	ZIN 1 N6 - ASP 25.A OD1 - ZIN 1 H7	3.086 2.138
ZINC000533478965	0	-	-
ZINC000506629255	1	ZIN 1 N10 - ASP 25.AOD1 - ZIN 1 H11	2.932 2.002
ZINC000196811925	0	-	-
ZINC000506629258	1	ZIN 1 N10 - ASP 25.A OD1 - ZIN 1 H11	2.967 2.244
ZINC000490007864	0	-	-
ZINC000290077738	2	GLN 73.A NE2 - ZIN 1 N20 - GLN 73.A HE21	3.324 2.358
		ZIN 1 O1 - ASP 25.A OD1 - ZIN 1 H27	2.871 2.156
ZINC000055553132	0	-	-

Taula 4. Informació sobre els enllaços d'hidrogen establerts entre el receptor Sigma 2 i cada un dels compostos de Sigma 1 segons el docking molecular.

<u>Compost</u>	<u>n° Enllaços</u>	<u>Enllaç d'hidrogen</u> <u>(Donador/Aceptor/Hidrogen)</u>	<u>Distància (Donador-Aceptor, Aceptor-Hidrogen, Å)</u>
10474335	1	LIG 1 N1 - ASP 25.A OD2 - LIG 1 HN	3.023 2.040
3559	1	LIG 1 N1 - ASP 25.A OD1 - LIG 1 HN	3.073 2.113
6438340	0	-	-
61W - 5HK1	1	61W 1 N04 - ASP 25.A OD2 - 61W 1 H04	3.086 2.134
4239764	0	-	-
54726191	0	-	-
7847471	0	-	-
53389	0	-	-
9829526	1	LIG 1 N1 - ASP 25.A OD1 - LIG 1 HN	2.623 1.736
441278	0	-	-

Cal destacar que pel docking del receptor Sigma 1 amb la llibreria de compostos de Sigma 2 no s'han observat ponts d'H i no s'han pogut valorar els resultats en aquest primer anàlisi. Això sembla indicar una menor qualitat del docking molecular en comparació amb les altres proves realitzades (veure més avall per una discussió més detallada)

A la Taula 2 corresponent als enllaços d'hidrogen predits per inhibidors coneguts del receptor Sigma 1 podem destacar la freqüència amb la què el Glutamat 165 forma enllaços d'hidrogen, especialment amb el grup HN del lligand. Aquest residu correspon al Glutamat 172 en l'estructura cristal·logràfica 5HK1, que tal i com es menciona a la introducció té un rol molt important en la unió del lligand i que mutar-lo suposa una gran pèrdua de l'afinitat. Alhora també veiem que l'Aspartat 119 estableix un

enllaç d'hidrogen amb el segon lligand més afí per S1R (53389), aquest correspon al Aspartat 126 que al mutar-lo també va suposar una disminució de més del 90% en l'afinitat en la majoria de compostos inhibidors de Sigma 1. Pel que fa als lligands, s'observa que la presència d'una amina protonada a l'inhibidor juga un paper clau en la formació d'enllaços d'hidrogen amb el centre actiu del receptor Sigma 1 (veure més avall per una explicació més detallada). Tal i com es pot veure a la Figura 6, pel lligand 61W el nitrogen de l'anell de piperidina juga un paper clau per establir i orientar l'inhibidor al centre actiu del receptor Sigma 1.

Per tal de validar els càlculs de docking molecular i les prediccions dels enllaços d'hidrogen, s'ha realitzat una comparativa entre els resultats del docking molecular pel lligand 61W i el PDB 5HK1 amb la corresponent estructura cristal·logràfica. Degut a la importància observada a la Taula 2 de l'Aspartat 126 i el Glutamat 172 s'han agafat de referència aquests residus per fer la validació del docking i les comparatives de posició i orientació entre els lligands tal i com es troben a l'estructura cristal·logràfica i al docking molecular (veure Figura 6).

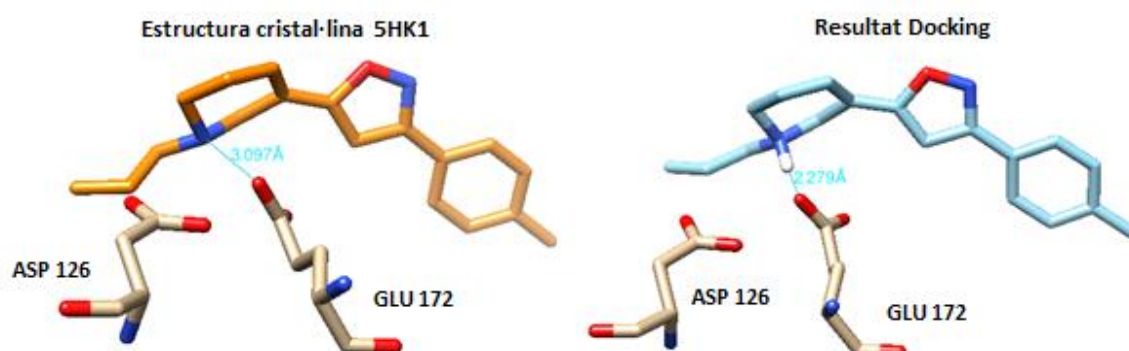


Figura 6. Comparativa de l'enllaç d'hidrogen entre Glu172 i el lligand 61W abans i després del docking en S1R. Imatge obtinguda amb el programa Chimera.

Amb aquesta comparativa podem comprovar la precisió dels càlculs de docking; veiem que en aquests càlculs s'ha mantingut un enllaç d'hidrogen entre el grup NH del lligand 61W amb el residu Glutamat 172, i que presenten unes distàncies similars (3.097 Å (entre donador i acceptor) en l'estructura cristal·lina i 2.279 Å (entre hidrogen i acceptor) un cop fet el docking). A més l'orientació i la posició del lligand és pràcticament la mateixa, cosa que cal tenir en compte per no menysprear possibles canvis en l'activitat i, per tant, efectivitat del lligand. Per tant, es pot concloure que el protocol de docking molecular utilitzat per la llibreria de compostos del receptor Sigma 1 s'han obtingut els resultats esperats. En la majoria de casos el docking ha trobat l'enllaç d'hidrogen clau per explicar-ne l'activitat a nivell molecular.

Pel que fa als resultats referent al receptor Sigma 2, tant per la Taula 3 que correspon al docking fet amb els lligands del mateix receptor, com a la Taula 4 corresponent al docking amb S2R (PDB 7M95) i els lligands de S1R, també es pot comprovar que hi ha un residu que estableix la majoria dels enllaços d'hidrogen amb aquests compostos, que és l'Aspartat 25. Aquest correspon a l'Asp 29 en l'estructura cristal·logràfica (PDB 7M95). Els compostos de Sigma 2 també presenten una amina protonada que interacciona amb l'àcid carboxílic de l'Aspartat 25. Tot i això, es pot comprovar a la Taula 4 corresponent al docking dels inhibidors de Sigma 1 amb el receptor Sigma 2 que el nombre d'enllaços d'hidrogen disminueix en comparació als observats a les Taula 2 on s'ha fet el docking dels inhibidors de Sigma 1 amb el receptor Sigma 1. Això pot indicar la pèrdua d'afinitat dels inhibidors de Sigma 1 vers el receptor Sigma 2, fet que donaria suport a la idea que mostren més selectivitat cap a S1R. Tot i això, en molts casos l'enllaç d'hidrogen amb l'amina persisteix.

Tal i com es pot veure a la Figura 7, on es mostra la validació dels resultats del docking pel lligand ZNC i el PDB 7M95, la predicció del docking pel lligand ZNC també ha estat bona fet que indica que aquest protocol també és adequat. A la predicció del docking el lligand s'orienta exactament de la mateixa manera que a l'estructura corresponent al PDB 7M95 i forma els mateix dos enllaços d'hidrogen amb l'Aspartat 29 i la Glutamina 77.

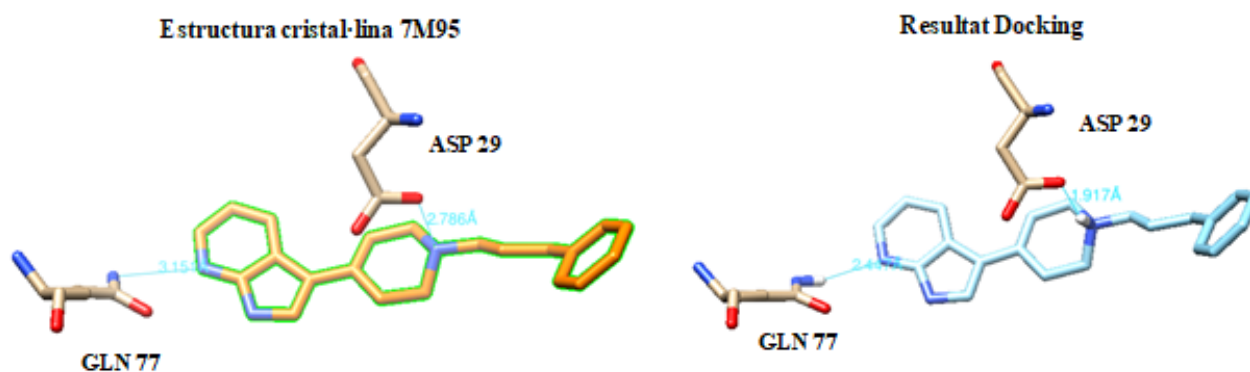


Figura 7. Comparativa dels enllaços d'Hidrogen entre Gln77 i Asp29 amb el lligand ZNC abans i després del docking en S2R Imatge obtinguda amb el programa Chimera.

Seguidament a les Figures 8 i 9 es mostren les orientacions predites pel docking molecular dels lligands de Sigma 1 i Sigma 2 pels receptors S1R i S2R respectivament. Es pot veure que en la majoria de casos el nitrogen de l'amina del lligand s'orienta cap als grups àcid carboxílic establint l'enllaç d'hidrogen mencionat anteriorment. En general l'orientació dels diferents lligands és similar a la del lligand de referència fet que valida els protocols de docking utilitzats pel que fa a la predicció de l'orientació i interaccions entre els inhibidors de Sigma 1 i Sigma 2 i els respectius receptors.

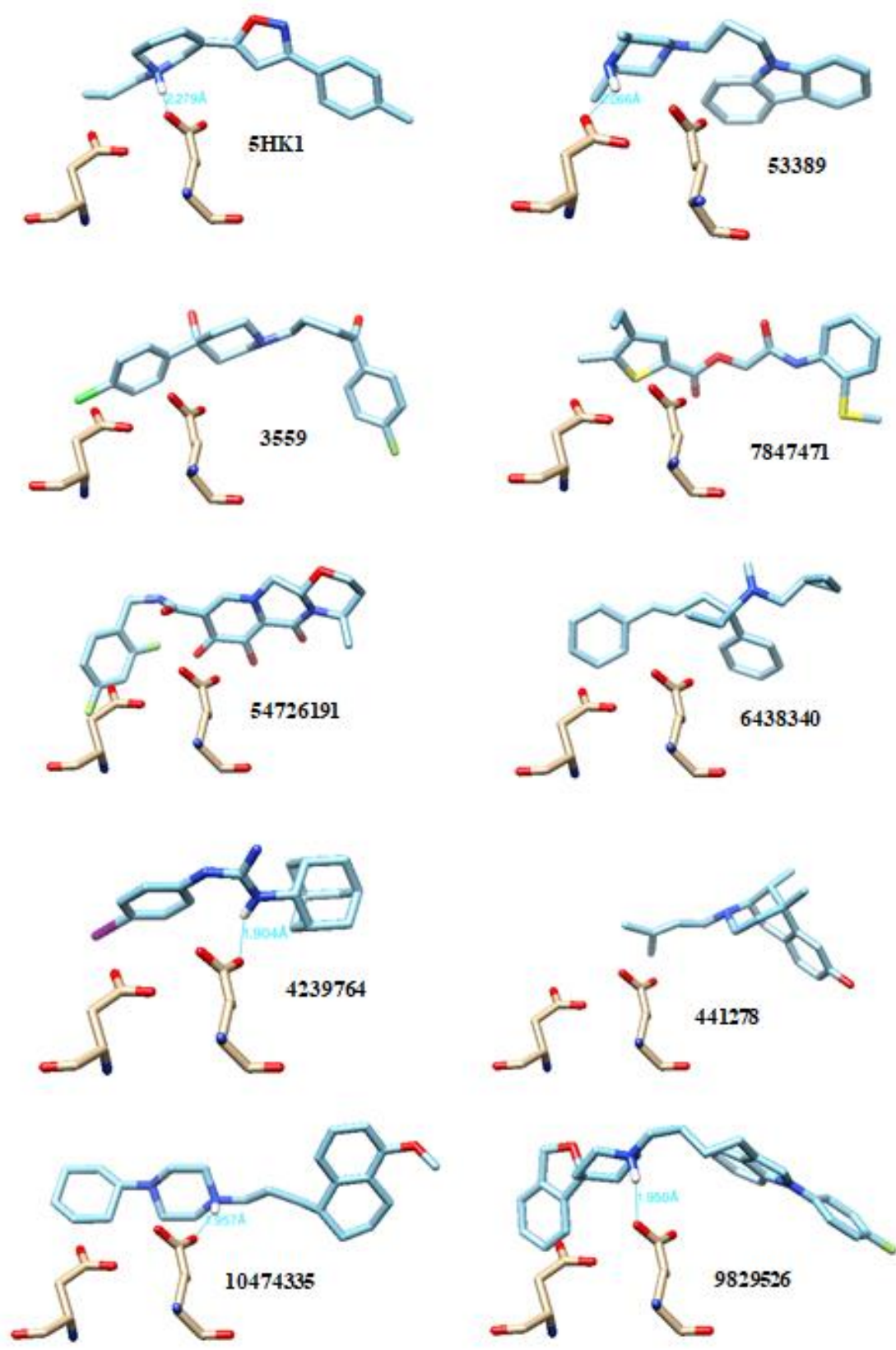


Figura 8. Posicions dels lligands de Sigma 1 respecte els residus Asp 126 i Glu 172 del receptor 5HK1 (S1R).
 Imatges obtingudes amb el programa Chimera.

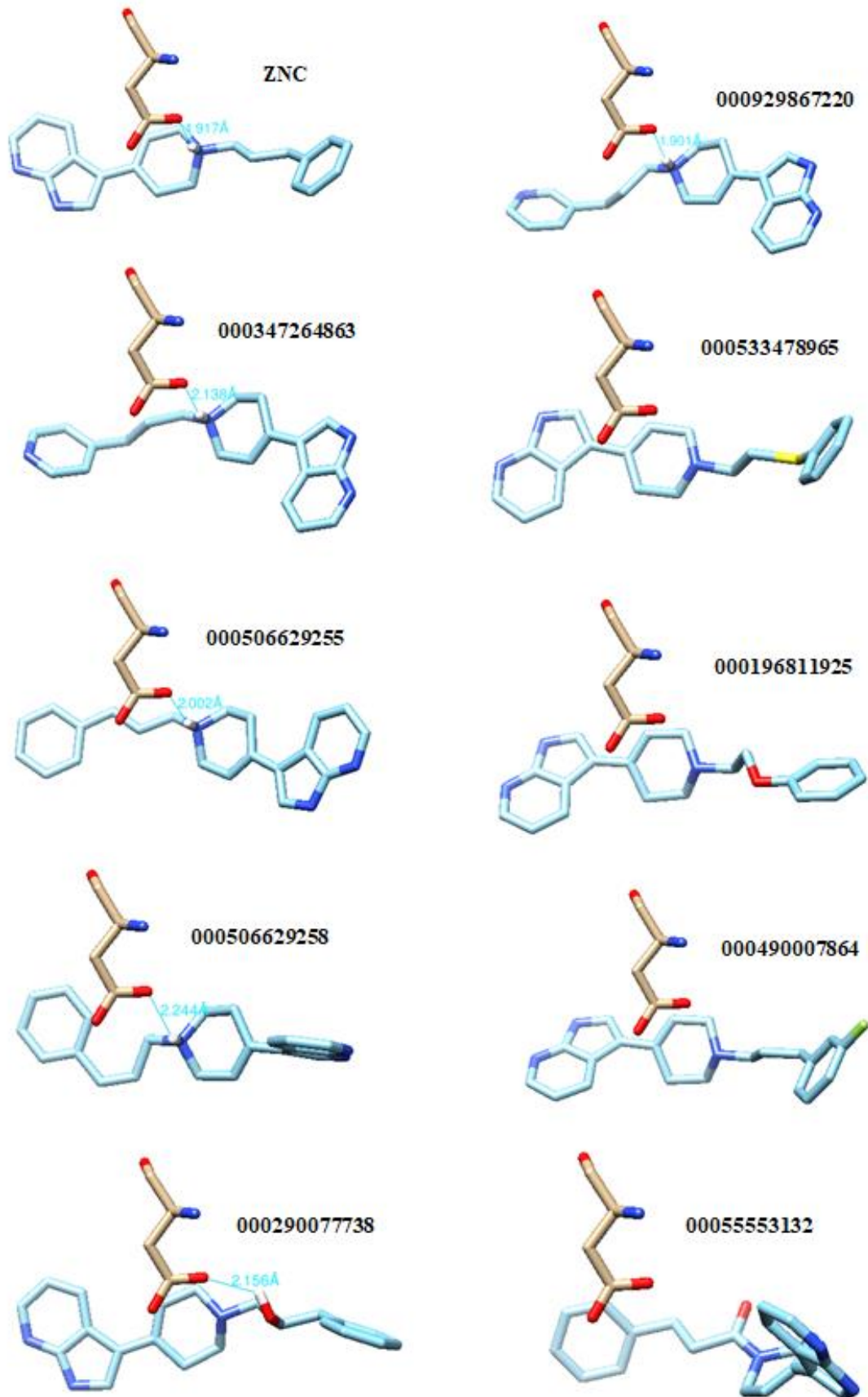


Figura 9. Posicions dels lligands de Sigma 2 respecte el residu Asp 29 del receptor 7M95 (S2R). Imatges obtingudes amb el programa Chimera.

Estudiar quina posició adopta cada lligand en el centre actiu del receptor ens permet comparar-los per trobar característiques estructurals i grups funcionals que els fan afins. Una d'aquestes propietats és la capacitat de formar enllaços d'hidrogen amb el receptor. Que com s'ha comentat anteriorment es dona amb molta freqüència entre uns residus del lloc d'unió en concret que presenten un grup carboxilat (COO⁻) i el grup amina (NH) protonat del lligand i contribueix significativament en l'estabilització del lligand, augmentant la seva eficàcia com a potencials agents terapèutics. Aquest grup amina forma part d'anells de piridina o forma part d'amines terciàries.

La presència del grup amina és un factor important que confereix afinitat en molts lligands tant per al receptor Sigma 1 com per a Sigma 2. Això fa que els inhibidors descrits per Sigma 1 presentin també afinitat pel receptor Sigma 2 i viceversa, ja que els dos receptors presenten una distribució similar de residus al lloc d'unió. Per aquest motiu pot ser complicat trobar compostos que puguin ser selectius per un dels dos receptors

A més tots els compostos presenten anells aromàtics que afavoreixen la unió mitjançant enllaços π - π amb els residus del centre actiu. Un altre característica estructural que cal tenir en compte a l'hora de considerar un compost com a potencial lligand és la flexibilitat molecular; ja que ha de ser suficientment flexible com per ajustar-se al centre actiu, això està vinculat en la presència d'enllaços rotacionals. A partir dels resultats obtinguts podem suggerir que explorar diferències en flexibilitat pot ser clau per dissenyar inhibidors que puguin ser més selectius.

4.2. Anàlisi de l'afinitat i selectivitat predita pels inhibidors de Sigma 1 i Sigma 2 en base a la mesura de grid score

Els càlculs de docking molecular no només proporcionen informació sobre la orientació i interaccions del lligand amb els aminoàcids que formen el lloc d'unió sinó que també es proporciona una estimació aproximada de l'afinitat d'un determinat lligand pel receptor. En el cas del programa Dock6 aquestes mesura d'afinitat s'anomena *Grid Score* i té en compte les interaccions electrostàtiques i de van der Waals que es donen entre el lligand i el receptor en l'orientació proposada. En aquest apartat s'ha col·leccionat els valors de Grid Score pels diferents càlculs de docking corresponents a les dues llibreries de compostos.

Taula 5. Valors de grid score per cada lligand i receptor, acompanyat de la diferència dels valors entre S1R i S2R.

<u>Compost</u>	<u>Grid Score per S1R (kcal/mol)</u>	<u>Grid Score per S2R (kcal/mol)</u>	<u>ΔG (kcal/mol)</u>
5HK1	-62.93921	-51.91397	-11.02524
53389	-61.90928	-45.18441	-16.72487
3559	-45.17815	-59.60639	14.42824
7847471	-42.69384	-46.58357	3.88973
54726191	-36.34742	-48.03586	11.68844
6438340	-26.65256	-52.14688	25.49432
4239764	-19.38234	-50.78308	31.40074
441278	75.36715	-37.84616	113.21331
10474335	83.79068	-74.88032	158.671
9829526	105.33196	-43.98631	149.31827
ZNC	-46.573009	-63.37551	16.802501
ZINC000929867220	-56.428177	-59.114986	2.686809
ZINC000347264863	-53.384007	-57.899979	4.515972
ZINC000533478965	-46.444126	-57.825356	11.38123
ZINC000506629255	-52.721306	-57.092468	4.371162
ZINC000196811925	-49.950478	-55.567909	5.617431
ZINC000506629258	-56.427521	-54.849953	-1.577568
ZINC000490007864	-42.747200	-53.284641	10.537441
ZINC000290077738	-36.895863	-50.866100	13.970237
ZINC000055553132	-38.013332	-41.297596	3.284264

En la Taula 5 s'exposen els valors del "grid score" del docking realitzat per les dues llibreries de compostos, aquests resultats ens permeten conèixer el nivell d'afinitat que tenen els lligands per cadascun dels receptors, essent un "grid score" més negatiu equivalent a una major afinitat. A la Taula 5 també es mostra la diferència entre els valors de "grid score" pels dos receptors. Pels compostos de la llibreria de Sigma 1 un valor de diferència entre "grid score" negatiu indica selectivitat cap a Sigma 1 mentre que valors positius indiquen selectivitat cap a Sigma 2. Pel cas de la llibreria de compostos de Sigma 2 l'efecte és el mateix, valors positius de "grid score" indiquen selectivitat cap a Sigma 2 mentre que valors negatius cap a Sigma 1.

Aleshores s'ha pogut comprovar que els compostos més afins de la llibreria són mateixos que contenen les estructures cristal·lines dels receptors (5HK1 i 7M95). Aquest fet per una banda confirma la viabilitat dels càlculs de docking realitzat pels lligands que estaven cristal·litzats juntament amb el receptor. Per altra banda cal destacar que tan el compost 61W com el ZNC mostra una afinitat marcada cap al receptor original, essent -11.03 kcal/mol i +16.80 respectivament.

Analitzant els resultats en general per a Sigma 1 podem destacar dos compostos que són més selectius que la resta: el 61W ja present en la estructura 5HK1 amb un grid score de -62.93921, i el Rimcazol (53389); un potent antagonista utilitzat en molts assajos, amb un grid score de -61.90928. En canvi hi ha tres compostos que han destacat per la poca afinitat, resultant en grid scores positius, un és el (+)-pentazocine (441278) i els altres dos el PB28 (10474335) i el Siramesine (9829526), els valors dels dos darrers es podria justificar per la presència de 4 anells i per el gran volum molecular que presenten, que com s'ha comentat a la introducció, són característiques que a diferència de S2R fan que disminueixi l'afinitat amb S1R, i això ho podem comprovar observant el grid score dels mateixos lligands però pel receptor Sigma 2, essent molt més negatiu.

A més a l'article del qual s'han extret aquests compostos s'indica que tot i presentar afinitat per a Sigma 1, PB28 i Siramesine tenen una acció putativa com a agonistes en Sigma 2, mentre que (+)-pentazocine és un agonista de Sigma en general. A més a més, alguns d'aquestes compostos al ser més grans potser que no càpiguen al centre actiu del receptor del PDB en concret, ja que aquest està predisposat pel lligand 61W quan per aquests compostos caldria que el centre actiu del receptor tingués un volum més gran. Això ens demostra les limitacions que té el Docking molecular per predir l'acció d'un lligand partint únicament de l'afinitat, per tant caldria un estudi més detallat i específic de cada un d'aquests compostos per entendre la relació amb la seva acció putativa.

Més avall a la taula es mostren els valors de l'encreuament dels lligands S2R en el receptor S1R, i els compostos ZINC000929867220 i ZINC000506629258 presenten un grid score molt similar d'entorn -56.42 que indica una alta afinitat amb Sigma 1. Aquests compostos que fins ara s'havia especulat que poden ser bons inhibidors de Sigma 2 podrien servir també com a punt de partida pel disseny d'inhibidors de Sigma 1.

Als resultats de Sigma 2, per als lligands de S1R els valors demostren bastanta afinitat, especialment el Rimcazol (53389) amb un grid score de -74.88032, per tant és més afí que el lligand natural de l'estructura cristal·lina (grid score ZNC= -63.37551). Aquest fet pot indicar que el centre actiu del receptor de Sigma 2 és més voluminós i dona cabuda a inhibidors com el Rimcazol.

La diferència dels grid score entre els dos receptors ens serveix per determinar per a quin presenta més selectivitat el lligand, si ΔG és positiu indica més afinitat per a S2R i si és negatiu per a S1R. Aleshores a la Taula 5 només observem que 3 dels 20 lligands són més selectius per S1R mentre que la resta presenta una preferència selectiva per S2R. En el cas dels compostos de S1R son uns resultats diferents dels que s'esperaven, ja que molts d'ells indiquen una afinitat major en el Docking de Sigma 2 contradient les dades de l'article d'on s'ha extret la llibreria. Això pot ser degut a errors durant la preparació de les estructures o en els paràmetres del docking, que tot i ser una eina molt avançada pot tenir limitacions ja que implica aproximacions que poden passar per alt la complexitat de les interaccions reals. Per tal d'explicar aquests resultats pot tenir un paper clau el volum del centre actiu, el lligand 61W que defineix el centre actiu del PDB 5HK1 és més petit que no el lligand ZNC que defineix el centre actiu del PDB 7M95. Això fa que el volum del centre actiu del PDB de Sigma 2 utilitzat com a referència sigui més gran que el de Sigma 1 i, per tant, que permeti encabir-hi millor tot tipus de lligand. Per tal d'aprofundir en aquest aspecte caldria realitzar els dockings molecular amb altres PDBs disponibles pels dos receptors.

A més, per confirmar aquests resultats caldria fer una validació amb estudis més avançats com mutagènesi o simulacions de dinàmica molecular, per identificar els residus claus que influeixen en la formació d'interaccions en cada cas, entendre amb més detall la conformació del centre actiu del receptor tenint en compte la flexibilitat d'aquest i la relació amb els grups funcionals dels lligands.

5. CONCLUSIONS

In this work, the interactions and selectivity of a series of inhibitors and Sigma 1 and Sigma 2 receptors have been explored. Sigma 1 (S1R) and Sigma 2 (S2R) receptors are proteins involved in various functions such as intracellular calcium regulation, oxidative stress regulation, and cellular signalling, which are associated with pathologies where these biological processes are altered, such as neurodegenerative diseases and cancer. One key aspect is the design of selective inhibitors for each of the receptors. Despite the advances in recent years, there are still no sufficiently selective inhibitors for S1R and S2R.

Here, we used and validated bioinformatics tools such as molecular docking to study Sigma 1 and Sigma 2 receptors both for their structural characteristics and their binding capacity and selectivity for ligands, providing a solid knowledge base from an emerging perspective like bioinformatics. To do

this, 10 compounds with known inhibitory activity for each of the receptors have been selected and docking has been performed with the crystallographic structures obtained from the PDB database, with codes 5HK1 for Sigma 1 and 7M95 for Sigma 2.

The results obtained from the molecular docking between the Sigma 1 and Sigma 2 receptors with the ligands have confirmed the importance of key residues for the formation of interactions, it has been seen that the residues Glu 172 in Sigma 1 and Asp 29 in Sigma 2 are the main hydrogen bond formers contributing to the affinity of ligands. In the same way, the ligand must present a hydrogen donor group that in most cases have coincided in an amine group. The analysis of the binding affinity through the grid score have verified that the most closely related compounds in the library are the same as those found in the 5HK1 and 7M95 crystal structures, although in the crossover most of the Sigma 1 ligands have showed a higher affinity for Sigma 2, this could be due to errors in the preparation of the structures or to docking limitations. In particular, further molecular docking calculations should be performed with PDBs other PDBs of Sigma 1 and Sigma 2 receptors that display different volumes.

In order to validate the results, additional studies would be considered that could strengthen the data and allow understanding of ligand-receptor interactions in a more complex and specific context. More advanced analysis is needed to determine the chemical and structural particularities that cause this preference. These bioinformatics tools can be used in the future for the design of new selective inhibitors for these receptors.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alon, A., Lyu, J., Braz, J. M., Tummino, T. A., Craik, V., O'Meara, M. J., Webb, C. M., Radchenko, D. S., Moroz, Y. S., Huang, X.-P., Liu, Y., Roth, B. L., Irwin, J. J., Basbaum, A. I., Shoichet, B. K., & Kruse, A. C. (2021). Structures of the σ_2 receptor enable docking for bioactive ligand discovery. *Nature*, 600(7890), 759-764. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04175-x>
- Alon, A., Schmidt, H. R., Wood, M. D., Sahn, J. J., Martin, S. F., & Kruse, A. C. (2017). Identification of the gene that codes for the σ_2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(27), 7160-7165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705154114>
- Brent, P. J., & Pang, G. T. (1995). σ Binding site ligands inhibit cell proliferation in mammary and colon carcinoma cell lines and melanoma cells in culture. *European Journal of Pharmacology*, 278(2), 151-160. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00115-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00115-2)
- Chu, U. B., & Ruoho, A. E. (2016). Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor. *Molecular Pharmacology*, 89(1), 142-153. <https://doi.org/10.1124/mol.115.101170>
- Fallica, A. N., Pittalà, V., Modica, M. N., Salerno, L., Romeo, G., Marrazzo, A., Helal, M. A., & Intagliata, S. (2021). Recent Advances in the Development of Sigma Receptor Ligands as Cytotoxic Agents: A Medicinal Chemistry Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(12), 7926-7962. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02265>
- Glennon, R. A. (2005). Pharmacophore identification for sigma-1 (σ_1) receptor binding: Application of the «deconstruction-reconstruction-elaboration» approach. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 5(10), 927-940. <https://doi.org/10.2174/138955705774329519>
- Hanner, M., Moebius, F. F., Flandorfer, A., Knaus, H. G., Striessnig, J., Kempner, E., & Glossmann, H. (1996). Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian σ_1 -binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 8072-8077.
- Hashimoto, K. (2015). Activation of sigma-1 receptor chaperone in the treatment of neuropsychiatric diseases and its clinical implication. *Journal of Pharmacological Sciences*, 127(1), 6-9. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2014.11.010>
- Hayashi, T., & Su, T.-P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*, 131(3), 596-610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.036>
- Hayashi, T., Tsai, S.-Y., Mori, T., Fujimoto, M., & Su, T.-P. (2011). Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(5), 557-577. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.560837>
- Hellewell, S. B., & Bowen, W. D. (1990). A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: Decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that of guinea pig brain. *Brain Research*, 527(2), 244-253. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91143-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91143-5)
- Hornick, J. R., Vangveravong, S., Spitzer, D., Abate, C., Berardi, F., Goedegebuure, P., Mach, R. H., & Hawkins, W. G. (2012). Lysosomal membrane permeabilization is an early event in Sigma-2 receptor ligand mediated cell death in pancreatic cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 31(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-41>
- Klette, K. L., DeCoster, M. A., Moreton, J. E., & Tortella, F. C. (1995). Role of calcium in sigma-mediated neuroprotection in rat primary cortical neurons. *Brain Research*, 704(1), 31-41. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01103-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01103-X)
- Lizama, B. N., Kahle, J., Catalano, S. M., Caggiano, A. O., Grundman, M., & Hamby, M. E. (2023). Sigma-2

Receptors—From Basic Biology to Therapeutic Target: A Focus on Age-Related Degenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6251. <https://doi.org/10.3390/ijms24076251>

- Mir, S. U. R., Ahmed, I. S. A., Arnold, S., & Craven, R. J. (2012). Elevated progesterone receptor membrane component 1/sigma-2 receptor levels in lung tumors and plasma from lung cancer patients. *International Journal of Cancer*, 131(2), E1-9. <https://doi.org/10.1002/ijc.26432>
- Mishra, A. K., Mavlyutov, T., Singh, D. R., Biener, G., Yang, J., Oliver, J. A., Ruoho, A., & Raicu, V. (2015). The sigma-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands. *The Biochemical journal*, 466(2), 263-271. <https://doi.org/10.1042/BJ20141321>
- Oyer, H. M., Sanders, C. M., & Kim, F. J. (2019). Small-Molecule Modulators of Sigma1 and Sigma2/TMEM97 in the Context of Cancer: Foundational Concepts and Emerging Themes. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01141>
- Schmidt, H. R., Betz, R. M., Dror, R. O., & Kruse, A. C. (2018). Structural basis for σ 1 receptor ligand recognition. *Nature structural & molecular biology*, 25(10), 981-987. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0137-2>
- Schmidt, H. R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., & Kruse, A. C. (2016). Crystal structure of the human σ 1 receptor. *Nature*, 532(7600), 527-530. <https://doi.org/10.1038/nature17391>
- Seth, P., Ganapathy, M. E., Conway, S. J., Bridges, C. D., Smith, S. B., Casellas, P., & Ganapathy, V. (2001). Expression pattern of the type 1 sigma receptor in the brain and identity of critical anionic amino acid residues in the ligand-binding domain of the receptor. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1540(1), 59-67. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(01\)00117-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(01)00117-3)
- Sigma-1 receptors control immune-driven peripheral opioid analgesia during inflammation in mice | PNAS.* (s. f.). Recuperado 28 de mayo de 2024, de <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1620068114>
- SIGMAR1—Sigma non-opioid intracellular receptor 1—Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt.* (s. f.). Recuperado 28 de mayo de 2024, de <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q99720/entry>
- Simony-Lafontaine, J., Esslimani, M., Bribes, E., Gourgou, S., Lequeux, N., Lavail, R., Grenier, J., Kramar, A., & Casellas, P. (2000). Immunocytochemical assessment of sigma-1 receptor and human sterol isomerase in breast cancer and their relationship with a series of prognostic factors. *British Journal of Cancer*, 82(12), 1958-1966. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1162>
- Spruce, B. A., Campbell, L. A., McTavish, N., Cooper, M. A., Appleyard, M. V. L., O'Neill, M., Howie, J., Samson, J., Watt, S., Murray, K., McLean, D., Leslie, N. R., Safrany, S. T., Ferguson, M. J., Peters, J. A., Prescott, A. R., Box, G., Hayes, A., Nutley, B., ... Eccles, S. (2004). Small molecule antagonists of the sigma-1 receptor cause selective release of the death program in tumor and self-reliant cells and inhibit tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 64(14), 4875-4886. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3180>
- Tchedre, K. T., Huang, R.-Q., Dibas, A., Krishnamoorthy, R. R., Dillon, G. H., & Yorio, T. (2008). Sigma-1 Receptor Regulation of Voltage-Gated Calcium Channels Involves a Direct Interaction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(11), 4993-5002. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-1867>
- Yamamoto, H., Miura, R., Yamamoto, T., Shinohara, K., Watanabe, M., Okuyama, S., Nakazato, A., & Nukada, T. (1999). Amino acid residues in the transmembrane domain of the type 1 sigma receptor critical for ligand binding. *FEBS Letters*, 445(1), 19-22. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00084-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00084-8)
- Zeng, C., Rothfuss, J., Zhang, J., Chu, W., Vangveravong, S., Tu, Z., Pan, F., Chang, K. C., Hotchkiss, R., & Mach, R. H. (2012). Sigma-2 ligands induce tumour cell death by multiple signalling pathways. *British Journal of Cancer*, 106(4), 693-701. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.602>

