

Bases moleculares de la selectividad de ligandos por receptores de melatonina

Julia A. Romera^{1,2*}, Álvaro Cortés-Cabrera², Pedro A. Sánchez-Murcia², Julio Álvarez-Builla³ and Federico Gago²

1 Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Área de Farmacología, Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **3** Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

Resumen

La hormona melatonina (MT), o *N*-acetil-5-metoxitriptamina, secretada por la glándula pineal, es responsable de la regulación del sueño y el ritmo circadiano a través de la modulación del núcleo supraquiasmático, entre otras funciones. MT actúa sobre 2 receptores diferentes, MT₁ (o MT_{1A}) y MT₂ (o MT_{1B}), que funcionan acoplados a proteínas G (GPCR). La propia melatonina y otros agonistas de los receptores MT pueden ser usadas para marcar los ritmos circadianos, facilitar el sueño o ejercer un efecto en los osciladores periféricos. Por otro lado, los antagonistas de estos receptores se pueden utilizar para mejorar nuestra comprensión del papel de la MT en el organismo. Sin embargo, los trabajos de diseño molecular basados en la estructura se ven obstaculizados por la ausencia de un modelo tridimensional (3D) experimental de los receptores MT₁ o MT₂. Los modelos construidos por técnicas de homología ayudan pero tanto el modo real de unión como el mecanismo de activación del receptor siguen estando definidos de forma imprecisa. En este trabajo, hemos utilizado las estructuras 3D recientemente publicadas de los receptores humanos 5-HT_{1B} and 5-HT_{2B} de serotonina (5HT) para construir modelos 3D de los receptores MT₁ y MT₂ humanos que sirven para explicar una serie de resultados experimentales, incluyendo los provenientes de estudios de mutagénesis dirigida y de selectividad de unión al receptor MT₂ de una serie de ligandos sintéticos publicados en la literatura. Nuestros modelos también explican la conservación evolutiva de ciertos aminoácidos clave en toda la familia de receptores MT y destacan las regiones del bolsillo de unión que pueden ser explotadas para conseguir perfiles distintos de selectividad entre los receptores de MT y 5HT.

Palabras clave: Receptores acoplados a proteínas G (GPCR); Melatonina; Receptores MT₁ y MT₂; modelado molecular; dinámica molecular; *docking*; relación estructura-actividad; mutagénesis dirigida.

Cita: Romera J, Cortés-Cabrera A, Sánchez-Murcia P A, Álvarez-Builla J, Gago F (2013) Bases moleculares de la selectividad de ligandos por receptores de melatonina. *Dianas* 2(2): e20130905. ISSN 1886-8746 journal.dianas.20130905 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 24 de junio de 2013.

Copyright: © 2013 Romera et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

*E-mail: julia.romera@uah.es



Introducción

La melatonina (MT) es una hormona derivada biosintéticamente del triptófano. Su secreción a la sangre desde la glándula pineal sigue un ritmo circadiano con niveles máximos durante el periodo de oscuridad. Aunque es mejor conocida por sus propiedades cronobióticas y de inducción del sueño, se ha relacionado con otros muchos efectos como la modulación de los sistemas cardiovascular e inmune, formación de huesos y secreción de hormonas. La MT se une y activa dos tipos de receptores, MT₁ (o MT_{1A}) y MT₂ (o MT_{1B}), que se expresan principalmente en el sistema nervioso central pero también en órganos periféricos [1].

MT₁ y MT₂ pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled receptors*, GPCR), los cuales se encuentran en la superficie celular y contienen 7 dominios transmembrana. Están involucrados en muchas enfermedades y constituyen la diana de ~40% de los fármacos utilizados actualmente.

La ausencia de un modelo tridimensional experimental de MT₁ y MT₂ obstaculiza el trabajo de diseño molecular basado en la estructura (*structure-based drug design*). Su predicción a partir de la de otros GPCR disponibles para ser usados como moldes es un reto porque la identidad de secuencia es limitada

($\leq 30\%$) y, además, tanto MT₁ como MT₂ carecen del patrón de residuos conservados en el sitio de unión del ligando responsable del anclaje de los sustituyentes polares de aminas endógenas como la adrenalina o la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). El reto es aun mayor debido a la falta de una buena descripción de los contactos ligando-receptor establecidos en los respectivos complejos [2].

El principal objetivo de este trabajo ha sido desarrollar modelos estructurales fiables de los receptores MT₁ y MT₂ que nos permitieran estudiar con detalle atómico el modo de unión de la MT y las bases moleculares de las afinidades y selectividad de distintos ligandos sintéticos por el receptor MT₂.

En esta memoria se utilizará, como es habitual, la nomenclatura de Ballesteros y Weinstein para la numeración de los aminoácidos (residuos) de los GPCR [3]. Cada residuo se identifica por 2 cifras (N1.N2), donde N1 es el número del segmento transmembrana en el que se encuentra y N2 un número que indica su posición respecto al residuo más conservado en los GPCR que recibe el número 50: decreciente hacia el extremo *N*-terminal y creciente hacia el extremo *C*-terminal.

Métodos

A lo largo de todo el proyecto hemos hecho uso intensivo del programa de gráficos moleculares interactivos PyMOL [4], que permite al usuario no solo visualizar sino también editar y manipular tanto moléculas pequeñas como macromoléculas biológicas y sus respectivos complejos. El primer paso consistió en superponer las estructuras conocidas de los GPCR cristalizados hasta la fecha para comprender su topología, características comunes y diferencias entre ellos [5].

Alineamiento de secuencias primarias y alineamientos tridimensional de estructuras.

El alineamiento de las secuencias primarias de los receptores de MT de distintos vertebrados obtenidas de la base de datos UniProt [6] se realizó mediante la herramienta conocida como *Washington University Basic Local Alignment Search Tool* (WU-BLAST) utilizando la implementación existente en el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) [7].

Para el alineamiento tridimensional de los GPCR cristalizados hasta la fecha utilizamos el programa Dali (*Distance matrix ALignment*, alineamiento de matriz de distancias) que basa el alineamiento estructural en contactar patrones de semejanza entre sucesivos hexapéptidos en las secuencias problema [8]. Puede generar emparejamientos o alineamientos múltiples [9], e identificar los vecinos estructurales de una secuencia problema en el Banco de Datos de Proteínas (*Protein Data Bank*, PDB) [10].

El alineamiento tridimensional complementa y refina el alineamiento de las secuencias primarias y proporciona información valiosa sobre la posición espacial de residuos equivalentes, en particular sobre aquellos que conforman la arquitectura de los respectivos sitios de unión específicos.

Construcción de los modelos por homología y validación de sus estructuras tridimensionales.

Phyre² (*Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0*) es un servidor automatizado para la predicción de la estructura tridimensional de una proteína de secuencia conocida mediante (i) predicción de los elementos de estructura secundaria [11] y (ii) comparación del patrón de plegamiento esperado con el existente en proteínas de estructura conocida [12]. En nuestro caso, obtuvimos >40 modelos para los receptores MT₁ y MT₂, 33 de los cuales presentaban un grado de confianza estimado del 100%. De éstos, seleccionamos aquellos que utilizaron como molde las estructuras de los receptores 5-HT_{1B} (código PDB: 4IAQ) [13] y 5-HT_{2B} (código PDB: 4IB4) [14] descritas recientemente en complejos con dihidroergotamina y ergotamina, respectivamente. No obstante, para el asa intracelular 3, utilizamos como molde el receptor β_2 adrenérgico completo (i.e. incluyendo el asa que conecta las hélices 5 y 6) cocristalizado con un agonista y un “nanocuerpo” (código PDB: 3P0G). Validamos la geometría de estos modelos y la estereoquímica de cada residuo de la proteína mediante PROCHECK [15] y ERRAT [16]. Para los trabajos posteriores elegimos de forma arbitraria los modelos construidos sobre la plantilla del 5-HT_{2B}, ya que ambos presentaban sitios de reconocimiento de ligando virtualmente idénticos.

Construcción de ligandos.

Para la construcción de los distintos ligandos (pequeñas moléculas con afinidad por el sitio receptor) utilizamos el programa CORINA [17] que es un generador de estructuras 3D de moléculas de pequeño tamaño que utiliza como entrada cadenas SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) consistentes en una serie de caracteres alfanuméricos ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*) que describen sin ambigüedad la estructura de una molécula. Algunos ligandos fueron construidos o modificados utilizando el editor molecular incorporado en PyMOL [4].

Nos centramos en los alineamientos de los receptores de 5-HT y MT. Realizamos un alineamiento de las secuencias en el que podemos comparar los residuos del sitio de unión al ligando (Figura 2a).

También realizamos un alineamiento de las secuencias de los receptores de MT de distintas especies de vertebrados con el fin de reconocer los aminoácidos que se conservan evolutivamente y que por tanto podrían explicar la unión del ligando común (Figura 2b).

Con el alineamiento 3D de estos mismos receptores comprobamos como están colocados estos residuos en el sitio de unión y estudiamos las diferencias y la selectividad de cada receptor por su ligando.

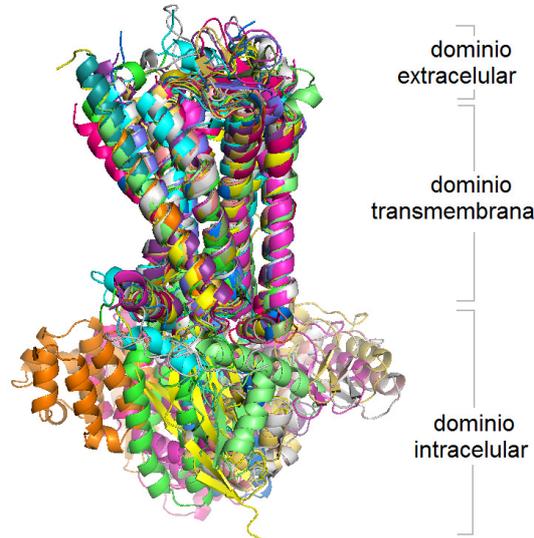


Figura 3.- Alineamiento 3D de los GPCR en PyMOL. El asa intracelular 3 de las estructuras de los GPCR está sustituida para facilitar la cristalización, por lo que se trata de proteínas quiméricas.

La conservación de la secuencia es mayor en los segmentos transmembrana que en las regiones extra e intracelulares, en las que hay un grado mayor de variación de la secuencia. Esto hace que al generar un modelo a partir de un molde, como en nuestro caso, el resultado sea más fiable para las hélices (que conforman el sitio de unión de los ligandos ortostéricos), que para las asas extra e intracelulares [24].

Descripción de los complejos refinados.

Los modelos de los receptores MT₁ y MT₂ humanos comprenden desde el aminoácido Ala29 hasta Phe320 y desde Pro34 hasta Asn328, respectivamente, y los parámetros geométricos evaluados para ambos se encontraron dentro de los límites esperados para proteínas plegadas en su forma nativa, por lo que fueron aceptados como válidos.

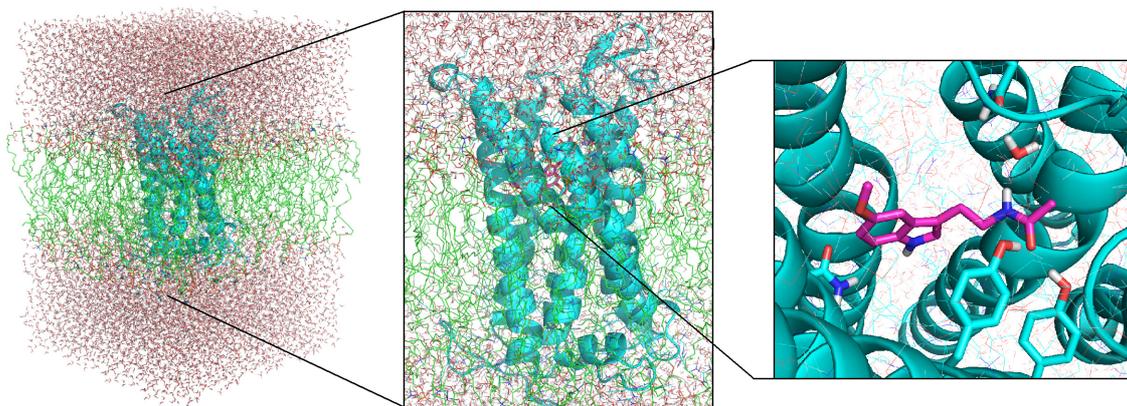


Figura 1.- Modelo del receptor humano MT₂ incorporado longitudinalmente en una membrana de lípidos y rodeado a ambos lados de la membrana por moléculas de agua y contraiones.

Arquitectura del sitio de unión y residuos implicados en el reconocimiento de ligandos.

Serotonina se une en el bolsillo de unión de su receptor 5-HT_{2B} principalmente a través de interacciones polares con 3 residuos: Thr140^{3,37}, cuya cadena lateral establece un enlace de hidrógeno con el grupo NH del indol; Asn344^{6,55}, cuya carboxamida enlaza con el 5-OH; y Asp135^{3,32}, cuyo carboxilato forma un enlace iónico fuerte con el grupo amino protonado. La posición de este carboxilato, a su vez, está fijada

espacialmente por el grupo hidroxilo de la Tyr370^{7.43}, la cual se encuentra estrictamente conservada en los GPCR que reconocen aminas biógenas. Además, el anillo del indol establece interacciones apolares con Phe340^{6.51} y Phe341^{6.52}.

En MT₁ y MT₂, la posición del Asp135^{3.32} de 5-HT_{2B} está ocupada por Met107^{3.32} y Met120^{3.32}, respectivamente. Este cambio imposibilita la formación de un enlace de hidrógeno con la Tyr298^{7.43} y un grupo amino protonado, discriminando así frente a las aminas biógenas (Figura 5). En cambio, una segunda tirosina, Tyr294^{7.39} que se encuentra conservada en todos los receptores de MT de vertebrados (Figura 3b), establece un enlace de hidrógeno con el oxígeno del grupo amida de MT.

La posición equivalente al residuo Thr140^{3.37} de 5-HT_{2B} es Ile112^{3.37} en MT₁ e Ile125^{3.37} en MT₂. Esta sustitución impide que se pueda formar un enlace de hidrógeno entre la cadena lateral de este aminoácido y el grupo NH del indol de MT, lo que fuerza a este grupo a interactuar con la carboxamida de Asn268^{6.52}, otro residuo invariante en todos los receptores MT₁ y MT₂.

Otro residuo altamente conservado en MT₁ y MT₂ es Asn175^{4.60}, para el cual proponemos una interacción de enlace de hidrógeno mediado por una molécula de agua con el nitrógeno amídico de MT (Figura 5).

Por último, la presencia de 5-metoxi en MT en lugar de 5-hidroxi en 5-HT elimina la posibilidad de que este grupo hidrófobo sea donador de enlace de hidrógeno. Además este residuo Asn344^{6.55} está sustituido por Gly271^{6.55}.

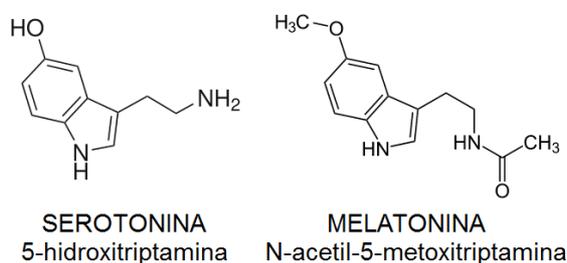


Figura 4.- Estructuras de 5-HT (el grupo amino estaría protonado a pH fisiológico) y MT.

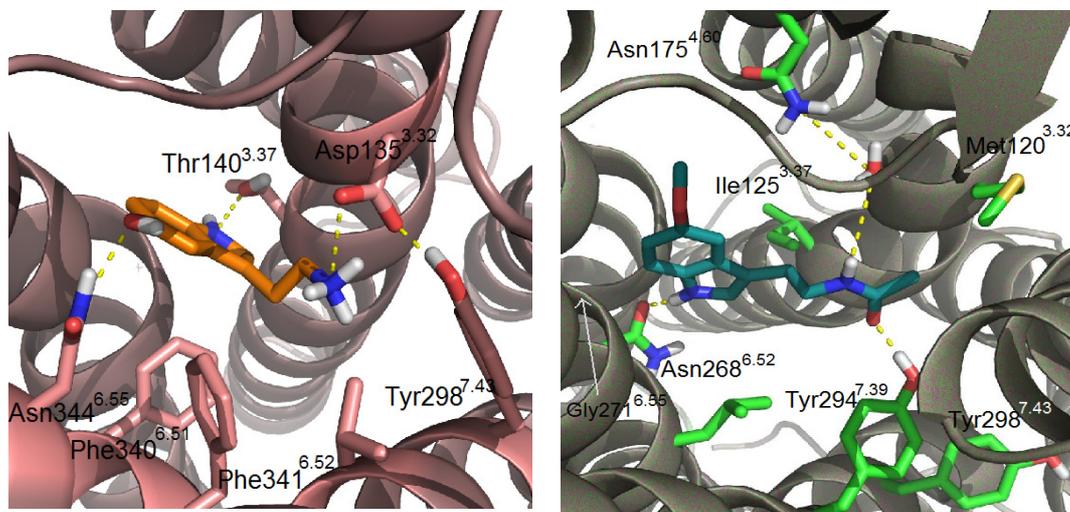


Figura 5.- Imágenes tridimensionales del sitio de unión de serotonina (rosa) y melatonina (verde). Se pueden observar los residuos que establecen las interacciones para el anclaje del ligando.

Modo de unión de antagonistas y bases moleculares de la selectividad por MT₂.

A pesar de que los residuos implicados directamente en la unión de MT en MT₁ y MT₂ son los mismos, existen diferencias en los residuos adyacentes que podrían explicar las distintas afinidades de una serie de ligandos, tanto agonistas como antagonistas (Figura 6): los residuos Val84^{2.61}, Ile115^{3.40} y Val159^{4.57} en MT₁ son posicionalmente equivalentes a Ile97^{2.61}, Val 128^{3.40} y Leu 172^{4.57} en MT₂, respectivamente.

Encontramos que los agonistas no selectivos actualmente comercializados, como ramelteón (Rozerem[®]) y agomelatina (Valdoxan[®]), se anclan al receptor de manera muy similar a MT. Por el contrario, para la unión de antagonistas como *N*-acetil-2-benzilriptamina (Lucindol) y 4-fenil-2-propionamidotetralina (4P-PDOT) proponemos un modo de unión diferente, que además explica la afinidad diferencial de los 4 diastereoisómeros de 4P-PDOT publicada recientemente [1].

En MT₁ existe una Ile115^{3,40} que dificulta la entrada del fenilo exocíclico de lucindol y 4P-PDOT. Sin embargo en el receptor MT₂ la posición equivalente está ocupada por Val 128^{3,40}, cuya cadena lateral es más corta, permitiendo así un mejor encaje y una mayor afinidad por el receptor [25].

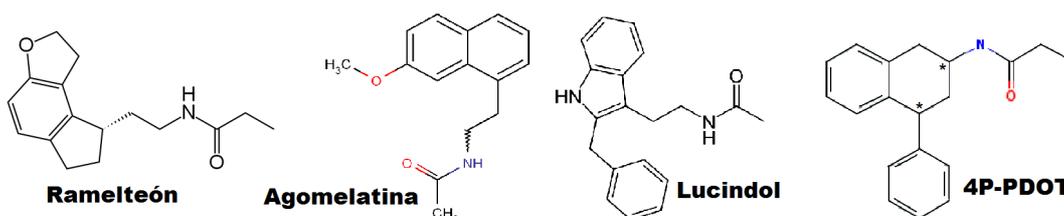


Figura 6.- Estructura de los agonistas (ramelteón y agomelatina) y antagonistas (lucindol y 4P-PDOT) estudiados en esta memoria.

Compuesto	$pK_i \pm SEM^a$ MT ₁	$pK_i \pm SEM^a$ MT ₂
Melatonina	9.58 ± 0.15	9.47 ± 0.12
(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4P-PDOT	7.02 ± 0.11	9.26 ± 0.14
(2 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4P-PDOT	6.59 ± 0.06	7.01 ± 0.05
(2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-4P-PDOT	6.89 ± 0.09	8.02 ± 0.15
(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4P-PDOT	5.67 ± 0.19	6.10 ± 0.15

Tabla 1.- Afinidad de unión de melatonina y los 4 diastereoisómeros del antagonista 4P-PDOT por los receptores humanos MT₁ y MT₂ [1].

Como se ve en la Tabla 1, el diastereoisómero (2*S*,4*S*) es el que presenta tanto mayor afinidad por ambos receptores como una mayor selectividad por el receptor MT₂ mientras que el (2*S*,4*R*) presenta el perfil opuesto.

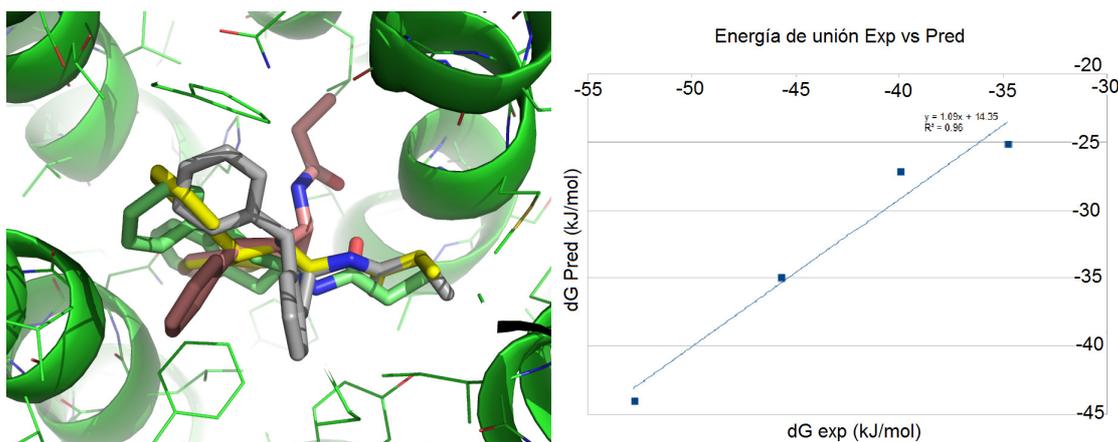


Figura 7.- Superposición de los 4 diastereoisómeros de 4P-PDOT en el sitio de unión del receptor MT₂ (izda.) y correlación entre las energías de unión calculadas en el modelo mediante la función HYDE [23] y las determinadas experimentalmente [1].

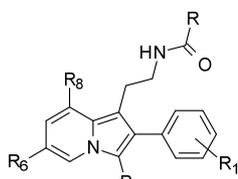
Aplicación práctica en el entorno de la UAH.

El grupo de química orgánica del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá ha sintetizado una serie de indolizinas como posibles ligandos de los receptores MT₁ y MT₂ y han determinado su afinidad por los mismos en comparación con la que muestran por el receptor 5-HT_{2B} (Tabla 2). Hemos utilizado nuestros modelos de estos receptores para encajar estos ligandos e intentar explicar las relaciones estructura-afinidad.

El modo de unión de estas indolizinas es similar al de 4P-PDOT (Figura 7), que también carece de un donador de enlace de hidrogeno en el anillo heterocíclico, lo que nos induce a pensar que posiblemente se trate de antagonistas.

El hallazgo de que extender la longitud del sustituyente R desde un metilo hasta un propilo conduce a un incremento de la afinidad mientras que su sustitución por un anillo resulta desfavorable sugiere la existencia de un hueco hidrófobo de dimensiones definidas. Esto es consistente con el bolsillo que configuran las cadenas laterales de Val84^{2,61} / Ile97^{2,61}, Met107^{3,32} / Met120^{3,32}, y Tyr280^{7,39} / Tyr294^{7,39} en MT₁ y MT₂, respectivamente.

En cuanto al sustituyente sobre el fenilo exocíclico, R₁, se deduce que un grupo en la posición 'para' mejora la afinidad por ambos receptores mientras que en 'orto' resulta desfavorable y en 'meta' aporta mayor afinidad únicamente por MT₂, debido a la presencia de una valina en la posición 3.40 en este receptor.



Código UAH (Nr)	Afinidad (K _i nM)			Diferencias con respecto a 8a (R= Me, R _{1,3,6,8} = H)
	MT ₁	MT ₂	5-HT _{2B}	
TCC-S-0536 (8b)	26	0.9	>10000	R ₁ = 4-Me
TCC-S-0539 (8d)	>10000	31	>10000	R ₁ = 3-OMe
TCC-S-0165 (8ac)	0.8	0.07	-	R ₈ = OMe
TCC-S-0120 (8ad)	4	5	-	R ₁ = 4-Me R ₈ = OMe
TCC-S-0119 (8ae)	0.4	2	-	R ₁ = 4-OMe R ₈ = OMe
TCC-S-0145 (8af)	0.4	0.7	-	R ₁ = 3,4-OMeO R ₈ = OMe
TCC-S-0144 (8ag)	51	300	-	R ₁ = 3,4,5-triOMe R ₈ = OMe
TCC-S-0259 (8at)	0.2	0.04	-	R= Et R ₁ = 4-I R ₈ = OMe
TCC-S-0465 (10f)	20	0.07	20	R= Et R ₁ = 2-Cl R ₃ =Br + 5-Br R ₈ = OMe

Tabla 2.- Estructura y afinidades de algunas indolizinas sintéticas seleccionadas.

El por qué un grupo metoxilo en la posición R₈ dota a los ligandos de una mayor afinidad por MT₁ encuentra explicación en el hecho de que la Leu172 en la posición 4.57 de MT₂ se corresponde con Val159^{4,57} en MT₁. La ausencia de variación en la afinidad al introducir un sustituyente en R₃ es compatible con la existencia de un espacio suficientemente amplio en la región sugerida por nuestros modelos.

La práctica totalidad de estas indolizinas carecen de afinidad por el receptor 5-HT_{2B}, siendo el ligando **10f** la excepción más llamativa, lo que puede explicarse por una interacción favorable entre el átomo de bromo en la posición 5 y la Gly221^{5,42}, cuya posición equivalente corresponde a una valina en ambos receptores de MT.

CONCLUSIONES

Los modelos construidos y refinados para los receptores MT₁ y MT₂ proporcionan unos bolsillos de unión de ligando (MT, los agonistas y antagonistas descritos y las nuevas indolizinas sintéticas) que permiten explicar las interacciones que estabilizan los respectivos complejos y las relaciones estructura-actividad.

Hemos identificado los aminoácidos que presumiblemente confieren selectividad de unión a MT y 5-HT: Asp135^{3,32}, Thr140^{3,37}, Phe340^{6,51}, Phe341^{6,52} y Asn344^{6,5} para el receptor 5-HT_{2B}; Met107^{3,32}, Ile112^{3,37}, Asn162^{4,60}, Asn250^{6,52}, Gly258^{6,55} y Tyr280^{7,39} para MT₁; y Met120^{3,32}, Ile125^{3,37}, Asn175^{4,60}, Asn268^{6,52}, Gly271^{6,55} y Tyr294^{7,39} para MT₂.

En su conjunto, nuestro trabajo revela que los métodos de modelado molecular y simulación pueden proporcionar información valiosa a la que no se puede tener acceso fácilmente mediante técnicas experimentales.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a laboratorios Servier (París) la determinación de las medidas de afinidad de las indolizinas.

REFERENCIAS

1. Bedini, A., S. Lucarini, G. Spadoni, et al. 2011. Toward the definition of stereochemical requirements for MT₂-selective antagonists and partial agonists by studying 4-phenyl-2-propionamidotetralin derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54: 8362-8372.
2. Pala, D., T. Beuming, W. Sherman, et al. 2013. Structure-based virtual screening of MT₂ melatonin receptor: influence of template choice and structural refinement. *J. Chem. Inf. Model.* 53: 821-835.
3. Ballesteros, J. A. and H. Weinstein. 1995. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences*. 25: 366-428.

4. DeLano, W. L. 2013. The PyMOL Molecular Graphics System.
5. Tate, C. G. 2012. A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures. *Trends in Biochemical Sciences*. 37: 343-352.
6. Apweiler, R., A. Bairoch, C. H. Wu, et al. 2004. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*. 32: 115-119.
7. McWilliam, H., W. Li, M. Uludag, et al. 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*. 41: 597-600.
8. Holm, L. and C. Sander. 1996. Mapping the protein universe. *Science*. 273: 595-603.
9. Institute of Biotechnology University of Helsinki. 2007. Dali server: Protein Structure Database Searching by DaliLite v. 3. http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/start.
10. Bernstein, F. C., T. F. Koetzle, G. J. Williams, et al. 1977. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *Journal of Molecular Biology*. 112: 535-542.
11. McGuffin, L. J., K. Bryson and D. T. Jones. 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*. 16: 404-405.
12. Kelley, L. A. and M. J. Sternberg. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*. 4: 363-371.
13. Wang, C., Y. Jiang, J. Ma, et al. 2013. Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science*. 340: 610-614.
14. Wacker, D., C. Wang, V. Katritch, et al. 2013. Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*. 340: 615-619.
15. Laskowski, R. A., M. W. Macarthur, D. S. Moss, et al. 1993. *PROCHECK*: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26: 283-291.
16. Colovos, C. and T. O. Yeates. 1993. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2: 1511-1519.
17. Molecular Networks GmbH. 2013. Interactive 3D Structure Generation with CORINA. http://www.molecular-networks.com/online_demos/corina_demo_interactive.
18. Dolinsky, T. J., P. Czodrowski, H. Li, et al. 2007. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Research*. 35: 522-525.
19. Lindorff-Larsen, K., S. Piana, K. Palmo, et al. 2010. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*. 78: 1950-1958.
20. Skjevik, Å. A., B. D. Madej, R. C. Walker, et al. 2012. LIPID11: A Modular Framework for Lipid Simulations Using Amber. *The Journal of Physical Chemistry B*. 116: 11124-11136.
21. Wang, J., R. M. Wolf, J. W. Caldwell, et al. 2004. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*. 25: 1157-1174.
22. Goodford, P. J. 1985. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry*. 28: 849-857.
23. Schneider, N., G. Lange, S. Hindle, et al. 2013. A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein-ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 27: 15-29.
24. Costanzi, S. 2013. Modeling G protein-coupled receptors and their interactions with ligands. *Current Opinion in Structural Biology*. 23: 185-190.
25. Dubocovich, M. L. 2007. Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep medicine*. 8 Suppl 3: 34-42.