

Interacción de las isoformas del receptor de glicina con glicina (GlyR/glicina) por estudios computacionales

Martínez Mosqueda Diana Stefany¹, Contreras Núñez Erika³, Millán Pacheco Cesar⁴,
Vicente Escobar Jonathan Osiris², Blancas Flores Gerardo^{1*}, Serratos Álvarez Iris Natzielly^{2*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud. Av. San Rafael Atlixco No. 186, Leyes de Reforma 1ra Sección, Iztapalapa, Ciudad de México, C.P. 09340, México.

²Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Química. Avenida San Rafael Atlixco No. 186. Colonia Vicentina, Ciudad de México, C.P. 09340, México.

³Universidad Tecnológica de Nezahualcóyotl, Departamento de Tecnología Ambiental. Circuito Rey Nezahualcóyotl, Benito Juárez, Estado de México, C.P. 57000, México.

⁴Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Farmacia, Avenida Universidad Número 1001, Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca Morelos, México.

*Autor para correspondencia: insa@xanum.uam.mx, gera@xanum.uam.mx

Recibido:

07/agosto/2021

Aceptado:

23/octubre/2021

Palabras clave:

Receptor GlyR/glicina,
acoplamiento molecular,
energía de unión

Keywords:

GlyR-glycine receptor,
molecular docking,
binding energy

RESUMEN

La glicina actúa regulando la vía TNF- α /NF- κ B bloqueando los procesos inflamatorios en adipocitos, a través de la participación de un receptor específico, asociado a canales de Cl⁻, compuesto de tres subunidades distintas α , β y gepirina. Actualmente no existen estructuras cristalográficas de las isoformas α 1, α 2 y α 4, solamente de α 3 de humano, por lo que esta subunidad fue utilizada para obtener los modelos por homología para el resto de las isoformas, permitiendo determinar la energía de unión (ΔG_u) entre las isoformas del GlyR/glicina. Los resultados indicaron que la unión está conducida por interacciones electrostáticas en las diferentes isoformas, principalmente por la participación de un glutámico y treonina en el sitio de unión del GlyR/glicina. La α 3 presentó mayor interacción, ya que su expresión es abundante en las células de médula. Estos resultados comprueban que si existe interacción entre la glicina y su receptor.

ABSTRACT

Glycine acts regulating TNF- α /NF- κ B pathway, blocking inflammatory processes in adipocytes, through the participation of a specific receptor, associated with Cl⁻ channels, composed of three different α , β and gephyrin subunits. Currently there are no crystallographic structures of the α 1, α 2 and α 4 isoforms, only of human α 3, therefore, this subunit was used to obtain homology models for the rest of the isoforms, allowing the determination of the binding energy (DG_b) between the GlyR/glycine isoforms. The results indicated that the binding is driven by electrostatic interactions in the different isoforms, mainly by the participation of a glutamic and threonine in the GlyR/glycine binding site. α 3 showed a greater interaction since its expression is abundant in marrow cells. These results prove that there is an interaction between glycine and its receptor.

Introducción

La glicina, es un aminoácido no esencial y de estructura simple constituida por un hidrógeno como cadena lateral (Figura 1). Este aminoácido se forma a partir del dióxido de carbono y del amoniacó por la acción de la glicina sintasa, que es una enzima cuyo cofactor es el fosfato de piridoxal. También se puede formar a partir de la L-serina por la acción de la serina-hidroximetil-transferasa, además ha sido utilizada como producto nutricional que participa en la biosíntesis de ácidos nucleicos, ácidos biliares, porfirinas, creatina fosfato y otros aminoácidos (Matilla *et al.*, 2002).

La glicina es considerada como un neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central, sus efectos están regulados por un receptor de glicina (GlyR) el cual es específico y se encuentra anclado a la membrana plasmática; y está asociado a canales de cloro (Cl⁻). (Lynch, 2004).

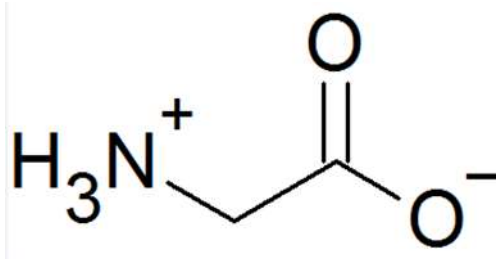


Figura 1. Estructura dianiónica de la glicina a pH fisiológico. La glicina presenta un $pK_{aCOO^-} = 2.34$ y otro $pK_{bNH_3^+} = 9.6$. La estructura fue construida con el programa ACD/ChemSketch Freeware. (<http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>)

El GlyR es un miembro de la familia de receptores de acetilcolina nicotínicos asociados a canales iónicos activados por ligandos, permitiendo que las células respondan rápidamente a los cambios externos. El GlyR es una proteína integral de membrana (proteína anclada a la membrana plasmática) asociada a canales de Cl⁻ y cuando la glicina se une a su receptor ejerce su acción inhibitoria (Chatterton *et al.*, 2002; Laube *et al.*, 2002). La señal inhibitoria bloquea la acción despolarizadora por incremento de la permeabilidad al Cl⁻ a través de la membrana, difundándose pasivamente (Lynch, 2004).

La glicina hiperpolariza la membrana plasmática por incremento de la conductancia al cloro (Zhong *et al.*, 2003); así, el receptor de la glicina es a menudo referido como un canal de cloro unido o sensible a glicina. El canal de glicina está constituido por 2 subunidades α y 3 subunidades β . Sin embargo, se ha observado que puede presentar cinco subunidades α , ambos canales se observan en la figura 2, respectivamente.

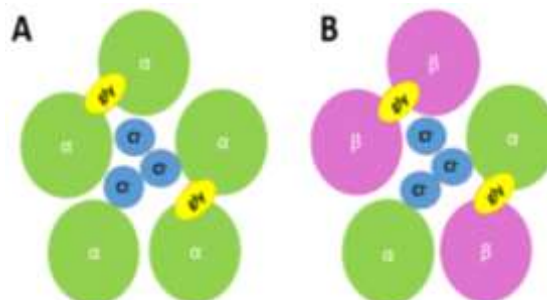


Figura 2. Modelos del canal de glicina (GlyR) A) Canal de glicina pentamérico formado por subunidades α B) Canal de glicina pentamérico formado por dos subunidades α y tres subunidades β . En color amarillo se muestra la interacción de glicina con las subunidades α y β de GlyR, inhibiendo el transporte de iones cloro al interior de la célula (color azul).

El GlyR es pentamérico y está compuesto de tres dominios: 1) dominio extracelular con plegamiento de hoja β de 58 kDa, 2) dominio transversal con un plegamiento de α -hélice de 48 kDa y 3) dominio intracelular de 93 kDa (Figura 3).

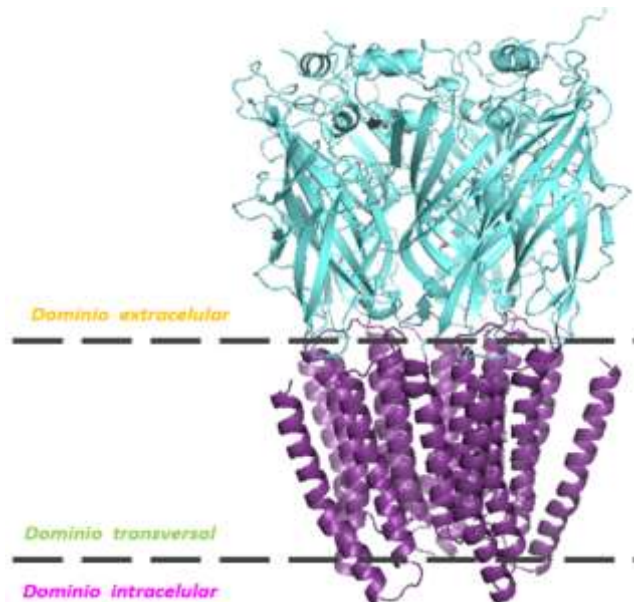


Figura 3. Dominios del GlyR: extracelular, transversal e intracelular. La figura fue visualizada con el programa Pymol (Schrodinger *et al.*, 2010).

En el Protein Data Bank (PDB) se encuentran estructuras cristalográficas de $\alpha 1$ y $\alpha 3$ de diferentes especies, entre ellas se encuentra la estructura de la isoforma $\alpha 3$ de humano del GlyR, donde cada monómero está unido a una glicina (ID PDB 5VDH) (Huang X *et al.*, 2017). Es importante mencionar que cada monómero del GlyR al interactuar con cada glicina permitió identificar los aminoácidos que participan en cada sitio de unión de $\alpha 3$.

(Figura 4). Esta estructura también se utilizó de molde para la obtención de los modelos por homología de las isoformas de $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$; y afortunadamente los sitios de unión se conservaron.

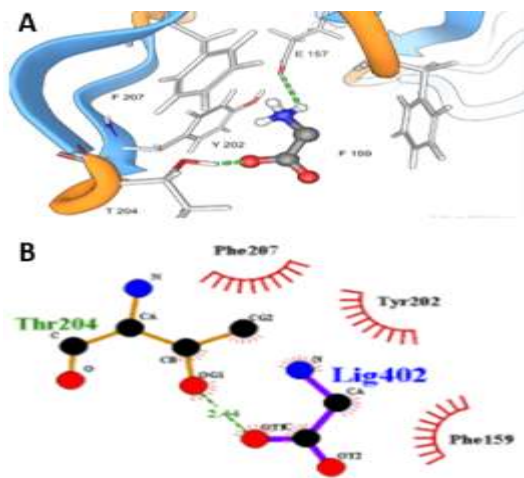


Figura 4. A) Mapa de interacción 3D del monómero A de la isoforma de $\alpha 3$ (ID PDB 5VDH) donde se observa la unión covalente de la glicina con GlyR. Se establecen dos puentes de hidrógeno: uno entre el NH_3^+ de la glicina con la cadena lateral del E157 de GlyR; y un puente de hidrógeno del COO^- de la glicina con el aminoácido T204. Figura obtenida con el programa *Maestro* Schödinger Company, 2019. B) Mapa de interacción 2D del monómero A de la isoforma $\alpha 3$ (ID PDB 5VDH) obtenida por el programa *Ligplot+* (Wallace A C *et al.*, 1996).

Las investigaciones realizadas *in vitro* e *in vivo* sobre los efectos de la glicina en adipocitos y otros tipos celulares, han demostrado que disminuye la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias y aumenta las antiinflamatorias.

La respuesta inflamatoria comienza con el reconocimiento de las señales intra y extracelulares, que pueden ser de origen infeccioso o inflamatorio, lo que ocasiona la activación celular y la síntesis de proteínas de fase aguda, modificando la respuesta efectora de las células inmunitarias. Durante esta respuesta se genera el reclutamiento de mediadores como las citocinas con efecto proinflamatorio, como el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina 1 beta ($\text{IL-1}\beta$), interleucina-12 (IL-12), interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$) e interleucina 6 (IL-6) (Dinarello, 2000).

Una de las rutas de transducción de señales más importantes durante la respuesta inflamatoria, es mediada por la activación del factor nuclear kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), la cual promueve la transcripción de genes que codifican para citocinas proinflamatorias (Alarcon-Aguilar *et al.*, 2010; Garcia-Macedo *et al.*, 2008). La regulación en la síntesis de estas citocinas durante el desarrollo de la inflamación ha permitido el estudio de

agentes capaces de inhibir este fenómeno, llevando al desarrollo de fármacos que actúan a diferentes niveles. El uso de la glicina representa uno de los blancos terapéuticos debido a sus efectos antiinflamatorios reduciendo la secreción de citocinas (Matilla *et al.*, 2002).

La identidad de la glicina como un neurotransmisor inhibitorio fue originalmente propuesta por Aprison *et al.*, 1968; Davidoff *et al.*, 1969, quienes describieron en detalle la distribución de la glicina a través del sistema nervioso central. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que también puede tener otras funciones fisiológicas, ya que se encuentran distribuidos en otros tejidos.

En los espermatozoides la activación de GlyRs y GABAARs es esencial para la reacción acrosómica (Sato *et al.*, 2000a; Sato *et al.*, 2000b), que permite la liberación de enzimas hidrolíticas que inducen diferentes modificaciones de proteínas y aseguran que el espermatozoide se mantenga fuertemente unido a la zona pelúcida del óvulo. Los GlyRs se encuentran en la membrana plasmática asociados a canales de cloro, los cuales se encuentran presentes en espermatozoides de ratón, hámster y humanos (Bray *et al.*, 2002; Harvey *et al.*, 2000).

En la línea celular de páncreas (GKP3) se expresan GlyRs que al ser activados por glicina causan una despolarización que aumenta la concentración intracelular de calcio (Weaver *et al.*, 1998). Las evidencias recientes sugieren la presencia de las subunidades GlyR/ $\alpha 1$, GlyR/ $\alpha 2$, GlyR/ $\alpha 4$ y GlyR/ β en células de Kupffer (Wheeler *et al.*, 2000). Así mismo, se ha descrito que en células de Kupffer, macrófagos, leucocitos y neutrófilos se sugiere que GlyRs pueden parcialmente mediar los efectos antiinflamatorios de la glicina asociado con la reducción en la concentración de calcio, inducido por lipopolisacáridos (Froh *et al.*, 2002).

En los estudios *in vitro* de la línea celular 3T3-L1 se sugiere la participación del receptor de la glicina podría resultar en una disminución de la fosforilación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ estimulada por $\text{TNF-}\alpha$ por lo tanto, GlyR podría estar participando, al menos en parte, en la inhibición de la ruta de señalización de $\text{TNF-}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Contreras *et al.*, 2018), en el cual Matilla *et al.*, 2002, describieron un posible mecanismo que implica la presencia de un receptor específico para la glicina en las células del sistema inmune, como células de Kupffer, macrófagos, etc. que, cuando se unen a él, aumenta el flujo de iones de cloro, lo que genera hiperpolarización de la membrana y por lo tanto, el bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje presentes en la membrana plasmática, el cual conduce a la hiperpolarización y bloquea la afluencia de calcio (Lynch, 2004; Webb y Lynch, 2007).

Actualmente no hay estudios sobre el modelaje computacional de la interacción de glicina con su receptor en adipocitos. Por lo anterior, en este trabajo se estudió la interacción de las isoformas del GlyR con glicina a través de estudios computacionales, con la finalidad de evaluar la energía de unión, lo que permitirá dar una interpretación completa sobre el mecanismo de acción de la glicina con su receptor en la respuesta inflamatoria.

Metodología

1. Preparación de las estructuras utilizadas para los cálculos computacionales

Se utilizaron las coordenadas atómicas de las moléculas involucradas para el análisis de las estructuras asociadas a GlyR/glicina. Se realizó búsqueda exhaustiva en el PDB y se descargó la estructura cristalográfica de $\alpha 3$ humano (ID PDB 5VDH). A esta estructura se le realizó una minimización con 100 pasos de steepest descent con el programa charmm, empleando el potencial charmm36 (Jo *et al.*, 2008). Las isoformas de los canales $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$ fueron modeladas por homología empleando el servidor iTasser (Yang *et al.*, 2014; Zhang Lab, 2017). Cada uno de los modelos fue minimizado con el mismo protocolo que se utilizó para $\alpha 3$.

2. Estudios de acoplamiento (docking) de los complejos GlyR/glicina

Para llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular de cada una de las estructuras se utilizó el programa PyRx (Dallakyan *et al.*, 2015). Durante la interacción de GlyR/glicina se obtuvieron aproximadamente 100 poses de todas las estructuras. Para llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular para la estructura de $\alpha 3$ (minimizada) se consideraron los aminoácidos presnetes en el sitio de unión: E157, Phe159, Tyr202, Thr204, Phe207 como se mostró en la figura 3. Este sitio de unión afortunadamente fue conservado en los modelos por homología, sin embargo, cambió la numeración ya que esto depende de la secuencia de cada isoforma. En el caso del modelo de $\alpha 1$ los aminoácidos fueron: Phe104, Tyr147, Thr149, Phe 152, E191; para el modelo $\alpha 2$ fueron: E191, Phe193, Tyr236, Thr238, Phe 241; y el modelo $\alpha 4$: E191, Phe193, Tyr237, Thr239 y Phe242. Finalmente, se seleccionaron los mejores conformeros de cada monómero que conforman el canal de glicina (monómeros A, B, C, D y E) bajo criterios energéticos y geométricos. En este trabajo se presentaron el mejor conformero para cada caso.

3. Cálculos de energía libre de unión (ΔG_u)

La energía de unión de los complejos GlyR/glicina se evaluó mediante cálculos computacionales. Las contribuciones de tipo electrostático y no electrostático se determinaron individualmente como se muestra a continuación:

$$\Delta G_u = \Delta G_{elec} + \Delta G_{no-elec} \quad \text{Ec. (1)}$$

Y a su vez

$$\Delta G_{elec} = \Delta G_{solv} + \Delta G_{coul} \quad \text{Ec. (2)}$$

Entonces, sustituyendo la Ec. 2 en la Ec. 1 se tiene:

$$\Delta G_u = \Delta G_{solv} + \Delta G_{coul} + \Delta G_{no-elec} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde el ΔG_u es la energía de unión y está en función de la energía electrostática, ΔG_{elec} , y de la energía no electrostática, $\Delta G_{no-elec}$. A su vez el ΔG_{elec} está en función de la energía de solvatación ΔG_{solv} (que es la energía necesaria para retirar el solvente del sitio activo para que se una la glicina al receptor) y de la energía coulombica, ΔG_{coul} (la energía de interacción entre las cargas del GlyR y las cargas de la glicina).

3.1 Preparación de las estructuras para los cálculos de la energía electrostática para el sistema GlyR/glicina

Con base en lo anterior, los mejores conformeros obtenidos del acoplamiento molecular se enviaron al programa PDB2PQR (Dolinsky *et al.*, 2004), para preparar el archivo del cristal minimizado ($\alpha 3$) y los modelos por homología ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$) para cálculos electrostáticos en un medio continuo, de acuerdo con la metodología de Nathan Baker (Baker *et al.*, 2001). Los archivos de salida del PDB2PQR (Dolinsky *et al.*, 2004) tuvieron un formato similar al PDB, ya que incorpora datos de carga y radio atómicos; y el archivo de salida se denomina PQR. En el caso de las moléculas de la glicina, se determinaron sus cargas y radios con el programa PDB2PQR (Dolinsky *et al.*, 2004). Posteriormente, estos archivos se corrieron en el programa Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) (Baker *et al.*, 2001) para calcular la energía electrostática a la unión de GlyR/glicina, resolviendo la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann (Baker, 2004).

3.2 Contribución no electrostática o no polar a la energía libre de unión para GlyR/glicina

La contribución al ΔG_u por parte de las interacciones no electrostáticas ($\Delta G_{no-elec}$) se evaluaron como la energía liberada al ocultar el área de la interfase al solvente cuando se forma el complejo, esta energía es proporcional al cambio en el área accesible al solvente y

un parámetro semejante a la tensión superficial (γ) con un valor de $0.021 \text{ kJ mol}^{-1}\text{Å}^{-2}$ para el agua: $\Delta G_{no-elec} = \gamma \Delta ASA_{interfase}$ (Friedman y Honing, 1995). Para determinar el área de interfase oculta del solvente en el complejo se utilizó el programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey *et al.*, 1996), a partir de los archivos PDB del complejo y de las moléculas en su forma libre:

$$\Delta G_{no-elec} = \gamma (ASA_{GlyR-glicina} - ASA_{GlyR} - ASA_{glicina})$$

Ec.(4)

Con los resultados anteriores, es posible estimar el valor de la energía libre de unión mediante la Ec. 1.

Cabe destacar que, en este trabajo se validó la técnica de acoplamiento molecular. Se realizaron cálculos de acoplamiento molecular de la glicina en cada monómero de la estructura cristalográfica 5VDH y con la estructura 5VDH minimizada obteniendo en todos los casos un RMSD (root-mean-square deviation) menor a 2 Å (datos no mostrados).

Resultados y discusión

A continuación, se muestran los traslapes de la glicina proveniente de la estructura 5VDH minimizada con cada uno de los modelos de las diferentes isoformas (Figura 5).

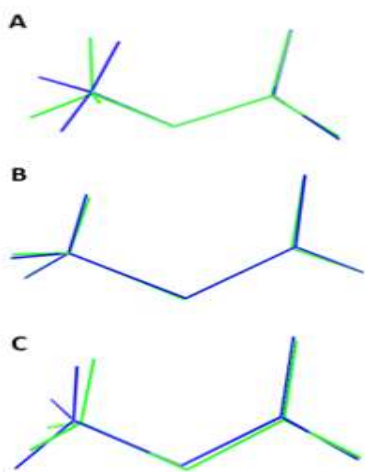


Figura 5. A) Traslape de la glicina de la estructura 5VDH minimizada (color azul) con la glicina del modelo $\alpha 1$ (color verde). B) Traslape de la glicina del cristal 5VDH minimizada (color azul) con la glicina del modelo $\alpha 2$ (color verde). C) Traslape de la glicina de la estructura de 5VDH minimizada (color azul) con la glicina del modelo de $\alpha 4$ (color verde). El estudio de RMSD arrojó valores menores de 1.4 Å , lo cual indica que el acoplamiento molecular fue realizado de manera correcta ya que los valores RMSD siempre deben ser menores a 2 Å .

1.1 Modos de unión de las isoformas de GlyR/glicina.

En la figura 6 se muestran los mapas de interacción de la estructura 5VDH minimizada y de las isoformas modeladas. En todos los casos el monómero A de las diferentes isoformas del GlyR mostró una mejor interacción en el sitio de unión con glicina.

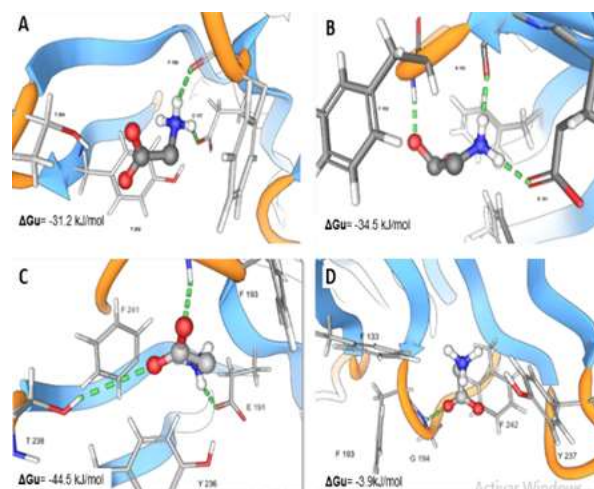


Figura 6. Interacción de acoplamiento molecular de los complejos. Figura visualizada con el software *Maestro* Schödinger Company, 2019.

En la figura 6A se puede observar el mapa de interacción de la estructura 5VDH minimizada con glicina, donde se establecieron dos puentes de hidrógeno con los oxígenos de las cadenas laterales de los aminoácidos de E157 y F159 con el grupo NH_3^+ de la glicina, conservando las mismas interacciones en la estructura cristalográfica 5VDH sin minimizar (Figura 3A). En el mapa de interacción del modelo $\alpha 1$ se estableció un puente de hidrógeno entre el COO^- de la cadena lateral del E191 y el grupo NH_3^+ de la glicina, un segundo puente de hidrógeno se estableció entre la cadena principal del S192 con el grupo NH_3^+ de la glicina, y un tercer puente de hidrógeno se estableció con el oxígeno de la cadena principal del F193 interactuando en el grupo COO^- de la glicina. En el caso del modelo $\alpha 2$ se estableció nuevamente un puente de hidrógeno entre el CO de la cadena lateral del E191 con el grupo NH_3^+ de la glicina, y dos puentes de hidrógeno con el OH de T238 y la cadena principal de F241, ambos unidos al grupo COO^- de la glicina. Finalmente, en el mapa de interacción del modelo $\alpha 4$ se observa la interacción de un puente de hidrógeno con el grupo COO^- de la glicina con el NH_3^+ de la cadena principal de la F133.

Por el contrario, se muestran los mapas de interacción de los monómeros que establecieron contactos menos favorables con glicina (Figura 7).

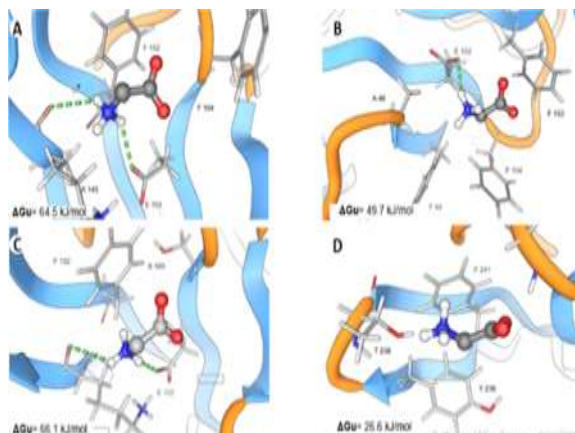


Figura 7. Mapas de interacción de los monómeros de las isoformas de GlyR con glicina menos favorables. Figura visualizada con el programa *Maestro* Schödingler Company, 2019.

En la figura 7 se muestran los monómeros B, C y D del modelo $\alpha 1$ (panel A, B y C respectivamente) los cuales presentaron interacciones desfavorables, esto debido a que se establecieron puentes de hidrógeno entre el grupo NH_3^+ de la glicina con las cadenas principales de los aminoácidos E102 y K145 (panel A), E102 (panel B), E102 y K145 (panel C). En el caso del monómero D del modelo $\alpha 2$ (panel D) se observó que no se establecieron puentes de hidrógeno y tampoco interacciones electrostáticas, lo cual provocó una disminución en el ΔG_u ver tabla 2.

1.2 Cálculos de energía de unión (ΔG_u)

A partir de la Ec. 1, se determinaron los valores de energía de cada componente del ΔG_u para cada monómero de la estructura 5VDH minimizada ($\alpha 3$) en su interacción con la glicina (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de energía de los monómeros de la estructura 5VDH minimizada con glicina a pH 7.0. Las energías se determinaron con los programas de APBS (Baker *et al.*, 2001) y VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

5VDH minimizado	ΔG_{solv} (kJ/mol)	ΔG_{coul} (kJ/mol)	$\Delta G_{no-elec}$ (kJ/mol)	$^*\Delta G_u$ (kJ/mol)
Monómero A/glicina	10.9	-36.3	-5.8	-31.2
Monómero B/glicina	14	-25	-6	-17
Monómero C/glicina	19.1	-23.1	-5.9	-9.9
Monómero D/glicina	20.5	-26.2	-5.4	-11.2
Monómero E/glicina	7.9	-31.6	-6.1	-29.8

$$^*\Delta G_u = \Delta G_{solv} + \Delta G_{coul} + \Delta G_{no-elec} \text{ (Ec. 3)}$$

Como se puede observar en la tabla 1, en los cinco monómeros, la unión es conducida por el componente electrostático y en menor proporción por el componente no electrostático del ΔG_u . Es importante señalar que los cinco monómeros de GlyR $\alpha 3$ presentaron valores de

energía favorables. Para el resto de las isoformas ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$) solo los monómeros A presentaron energía de unión favorable.

1.3 Modelos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$

Actualmente existe la estructura cristalina de $\alpha 3$ (5VDH), lo que permitió llevar a cabo estudios de modelado por homología del canal de $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$ para determinar el ΔG_u . A continuación, se muestran los valores del ΔG_u de los cinco monómeros de estas isoformas:

Tabla 2. Valores de energía de los modelos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$ con glicina a pH 7.0. Las energías se determinaron con los programas de APBS (Baker *et al.*, 2001) y VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

Modelo $\alpha 1$	ΔG_{solv} (kJ/mol)	ΔG_{coul} (kJ/mol)	$\Delta G_{no-elec}$ (kJ/mol)	$^*\Delta G_u$ (kJ/mol)
Monómero A/glicina	14.8	-43.8	-5.7	-34.5
Monómero B/glicina	44.2	26	-5.7	64.5
Monómero C/glicina	42.5	12.7	-5.6	49.7
Monómero D/glicina	46	25.9	-5.7	66.1
Monómero E/glicina	15.7	-43.9	-5.7	-32.9
Modelo $\alpha 2$				
Monómero A/glicina	0.2	-39.2	-5.4	-44.5
Monómero B/glicina	3.1	-36.9	-5.5	-39.3
Monómero C/glicina	9.9	-28.9	-4.9	-18
Monómero D/glicina	25.4	7	-5.7	26.7
Monómero E/glicina	27.4	-7.9	-5	14.6
Modelo $\alpha 4$				
Monómero A/glicina	18.8	-18.9	-5.5	-3.9
Monómero B/glicina	17.8	-17.8	-5.5	-5.2
Monómero C/glicina	38.7	-25.4	-5.6	-8.3
Monómero D/glicina	21.2	-10.9	-5.4	4.9
Monómero E/glicina	18.8	-17.1	-5.5	-4

$$^*\Delta G_u = \Delta G_{solv} + \Delta G_{coul} + \Delta G_{no-elec} \text{ (Ec. 3)}$$

En la tabla 2 se puede observar que la energía de los cinco monómeros de cada subunidad ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$) es conducida principalmente por la componente electrostática y en menor proporción por la componente no electrostática. En el modelo $\alpha 1$ los monómeros A y E presentaron energía más favorables con respecto a la estructura cristalográfica de $\alpha 3$, porque establecieron mayores contactos. Sin embargo, dichos contactos se establecieron entre las cadenas principales de los aminoácidos que forman parte del sitio de unión con la glicina. Es importante resaltar que no se establecieron contactos con las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte del sitio activo y la glicina, como sucedió con la estructura de $\alpha 3$. Para el caso del modelo $\alpha 2$, los monómeros A, B y C también presentaron energías muy favorables debido a que establecieron uniones entre las cadenas principales de algunos aminoácidos que forman parte del sitio activo con la glicina y además se conservó la interacción con la cadena lateral del aminoácido E191 con el grupo NH_3^+ de la glicina, esta última interacción se observó en la estructura de $\alpha 3$. Finalmente, en el modelo $\alpha 4$ todos los monómeros presentaron valores de energía menos

favorables respecto a la estructura de $\alpha 3$ y los modelos de $\alpha 1$ y $\alpha 2$, debido a que presentaron interacciones por puentes de hidrógeno con el grupo NH_3^+ de la glicina y con las cadenas principales de los aminoácidos E102 y K145. A pesar de que los monómeros conforman el canal de glicina, la unión y su comportamiento es independiente entre cada uno.

En todos los casos el ΔG_{solv} fue positivo porque está indicando que la desolvatación de las moléculas individuales son desfavorables, esto quiere decir, que se debe retirar moléculas de agua para que se puedan unir la glicina y el receptor.

1.4 Potenciales electrostáticos

Se determinaron los potenciales electrostáticos de los monómeros A de cada isoforma de GlyR, ya que estos monómeros presentaron mejores contactos de interacción y mejores valores de ΔG_u .

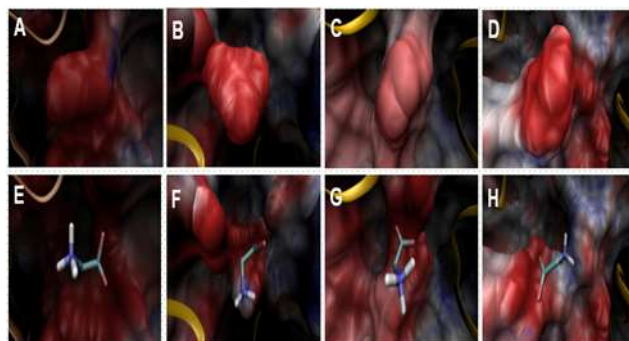


Figura 8. Potenciales electrostáticos. Se muestra el sitio de unión del monómero A de cada isoforma: A. Estructura 5VDH minimizado ($\alpha 3$). B. Modelo $\alpha 1$. C. Modelo $\alpha 2$ y D. Modelo $\alpha 4$. (E-H) Sitio de unión de cada isoforma de GlyR con glicina. El color azul indica cargas positivas, el color rojo cargas negativas y el color blanco cargas neutras. Las figuras se obtuvieron con el programa APBS (Baker *et al.*, 2001) y VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

En la figura 8 se observa que el sitio de unión de las diferentes isoformas del GlyR predominan las cargas negativas (color rojo) y esto es de esperarse porque en el sitio de unión y en la vecindad hay presencia de glutámicos y aspárticos (A-C). Sin embargo, en el panel D se muestra el sitio de unión del modelo $\alpha 4$ con cargas negativas y contactos neutros (color blanco). Al unirse la glicina en el sitio de las diferentes isoformas del GlyR se establecieron interacciones electrostáticas de tipo repulsivo, ya que el COO^- de la glicina está cercano a cargas negativas del sitio de unión. Por el otro lado, el NH_3^+ de la glicina establece interacciones electrostáticas favorables con el glutámico que forma parte del sitio de unión del GlyR. Debido a que la glicina tiene una carga positiva y una carga negativa a pH 7.0 puede establecer interacciones de tipo repulsivo y de atracción.

Estos resultados parecen explicar lo reportado en la literatura, la cual menciona que la subunidad $\alpha 1$ se expresa ampliamente en medula espinal en estadio embrionario postnatal y adulto, mientras que $\alpha 2$ se expresa abundantemente en la medula espinal en estado embrionario y postnatal, pero no en adulto; aunque hay bajos niveles de esta en el hipocampo, corteza cerebral, tálamo y retina. $\alpha 3$ se considera la más abundante, esta presente en etapa adulta en medula espinal, así como en algunas células dendríticas. Mientras que la distribución de $\alpha 4$ permanece elusiva debido a su escasez (CA Rueda *et al.*, 2009). Respecto a la parte molecular, la estructura de $\alpha 3$ nos permitió estudiar las interacciones que se establecieron con la glicina. Estos hallazgos indicaron interacciones de tipo electrostático y por puentes de hidrógeno, ésta última estableció uniones entre el grupo amino de la glicina con las cadenas laterales de los aminoácidos de treonina y glutámico de GlyR principalmente. También se observó que los valores de ΔG_u fueron favorables en los cinco monómeros (Tabla 1). Sin embargo, algunos monómeros de los modelos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$ presentaron un ΔG_u menos favorable (Tabla 2), ya que al interactuar con la glicina se establecieron puentes de hidrógeno con las cadenas principales de éstos y no con las cadenas laterales de los aminoácidos presentes en el sitio de unión, esto es de esperarse porque son modelos.

Conclusiones

Los resultados anteriores mostraron que la interacción de la glicina con su receptor es favorable y se establece principalmente por interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno. En nuestro grupo de investigación se van a realizar estudios de dinámica molecular para refinar los valores de energía y las interacciones de la estructura de $\alpha 3$ y de los modelos obtenidos por homología. Es importante reflejar la importancia de conocer estas interacciones lo que permitirá dilucidar el posible comportamiento de la glicina y su receptor en procesos inflamatorios.

Agradecimientos

Se agradece al Laboratorio de Visualización y Computación Paralela de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I) por el tiempo de cómputo.

Al Posgrado en Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Referencias

Alarcón A.F. J., Almanza P. J., Blancas, G., Ángeles S., García M., R Roman., R Cruz M. (2008). Glycine regulates the production of pro-inflammatory cytokines in lean and monosodium glutamate-obese mice. *Eur J Pharmacol.*, 599: 152-158.

- Aprison M.H., Shank R. P., Davidoff R. A., Werman R. (1968). The distribution of glycine, a neurotransmitter suspect in the central nervous system of several vertebrate species. *Life Sci.*, 7: 583-590.
- Aragón C., López C. B. (2009). Fisiopatología de la Neurotransmisión Glicinérgica., 147-176.
- Baker Na., Sept D., Holst M., McCammon J.A. (2001). Electrostatic of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98:10037-10041.
- Baker N. A. Poisson-Boltzmann methods for biomolecular electrostatics. *Methods Enzymol.*, 383: 94-118. 2004.
- Bray C., Son J.H., Kumar P., Harris J.D., Meizel S. (2002). A role for the human sperm glycine receptor/Cl (-) channel in the acrosome reaction initiated by recombinant ZP3. *Biol Reprod.*, 66: 91-97.
- CA Rueda., López B. (2009). Fisiopatología de la neurotransmisión glicinérgica. Avances en neurociencia: neurotransmisores y patologías nerviosas. ISBN 978-84-936890: 147-176.
- Chatterton J.E., Awobuluyi M., Premkumar L.S., Takahashi H., Talantova M., Shin Y., Cui J., Tu S., Sevarino K. A., Nakanishi N., Tong G., Lipton S.A., Zhang D. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, 415: 793-798.
- Contreras E., Blancas G., Cruz M., Almanza P. J., Gómez Z. J., Ventura G. J.L., Zentella D. A., Roberto L. R., Roman R., Alarcón A. F.J. (2018). Participation of the IKK- α/β complex in the inhibition of the TNF- α /NF- κ B pathway by glycine: Possible involvement of a membrane receptor specific to adipocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102: 120-131.
- Dallakyan S., Olson A.J. (2015) Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods Mol. Biol.*, 1263:243-250.
- Davidoff R.A., Aprison M.H., Werman R. (1969). The effects of strychnine on the inhibition of interneurons by glycine and gamma-aminobutyric acid. *Int. J. Neuropharmacol.*, 8(2):191-194.
- Dinarello C.A., (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118: 503-508.
- Dolinsky T. J., Nielsen J. E., McCammon J. A., Baker N. A. (2004). PDB2PQR: An Automated Pipeline for the Setup of Poisson-Boltzmann *Electrostatics Calculations*. *Nucleic Acids Res.*, 32: W665-667.
- Friedman R. A., Honig B. A. (1995). Free Energy Analysis of Nucleic Acid Base Stacking in Aqueous Solution. *Biophysical Journal.*, 69:1528-1535.
- Froh M., Thurman R.G., Wheeler M.D. (2002). Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 283: G856-863.
- Huang X., Chen H. y Shaffer P.L. (2017). Crystal Structures of Human GlyR alpha 3 Bound to Ivermectin. *Structure.*, 25: 945-950.e2.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996). VMD: Visual molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics.*, 14: 27-28, 33-38.
- Jo S, Kim T, Iyer VG y Im W. (2008). CHARMM-GUI: A Web-based *Graphical User Interface for CHARMM*. *J. Comput. Chem.* 29:1859-1865.
- Laube B., Maksay G., Schemm R. Y Betz H. (2002). Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 519-527.
- Lynch J.W. (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev.*, 84: 1051-1095.
- Matilla B., Mauriz J. L., Culebras J. M., González. G. J., y González P. (2002). La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutrición Hospitalaria.*, 17:2-9.
- Sato Y., Son J.H., Tucker R.P., Meizel S. (2000b). The zona pellucida-initiated acrosome reaction: defect due to mutations in the sperm glycine receptor/Cl (-) channel. *Dev Biol.*, 227: 211-218.
- Schrodinger, LLC. Nueva York, NY. (2010). El sistema de gráficos moleculares PyMOL.
- Schrödinger company. (2019). Recuperado junio 16 del 2021 de <https://www.schrodinger.com/our-story.pdf>
- Wallace A.C., Laskowski R.A and Thornton J.M. (1996). Derivation of 3D coordinate templates for searching structural databases: *application to Ser-His-Asp catalytic triads in the serine proteinases and lipases.*, 5: 1001-1013.
- Webb, T.I., Lynch, J.W., (2007). Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des.*, 13: 2350-2367.
- Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J. & Zhang Y. (2014). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction, *Nature Methods.*, 1: 7-8. doi: 10.1038/nmeth.3213.
- Zhang LAB (2017). I-TASSER protein structure & function predictions [Portal de servidor]. MI, US: Zhang Lab. Recuperado el 22 de marzo de 2021 de <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/pdf>
- Zhong Z., Wheeler M.D., Li X., Froh M., Schemmer P., Yin M., Bunzendaal H., Bradford B., Lemasters J.J., (2003). L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, 6: 229-240.