



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, División  
de Ciencias Biológicas y de la Salud.**

**“INTERACCIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE  
GLICINA CON GLICINA (GLYR/GLICINA) POR ESTUDIOS  
COMPUTACIONALES”.**

**TESIS  
PARA OBTENER EL DIPLOMADO  
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA  
BIÓL. DIANA STEFANY MARTINEZ MOSQUEDA  
MATRÍCULA: 2203802226**

**DIRECTORA  
DRA. IRIS NATZIELLY SERRATOS ÁLVAREZ**

**ASESOR  
DR. GERARDO BLANCAS FLORES**

**CIUDAD DE MÉXICO, 16 DICIEMBRE DE 2021.**

# ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Glicina.....	1
1.2 Proceso inflamatorio .....	1
1.3 Receptor de glicina .....	2
1.4 Interacciones en el reconocimiento molecular receptor GlyR/glicina .....	5
1.4.1 Tipos de interacciones no covalentes.....	6
1.5 Propiedades termodinámicas en la unión del receptor GlyR/glicina.....	7
2. ANTECEDENTES .....	8
3. JUSTIFICACIÓN .....	10
4. HIPÓTESIS .....	10
5. OBJETIVO GENERAL.....	11
5.1 Objetivos Particulares .....	11
6. METODOLOGÍA.....	11
6.1 Preparación de las estructuras utilizadas para los cálculos computacionales.....	11
6.2 Estudios de acoplamiento molecular .....	11
6.3 Cálculos de energía libre de unión GlyR/glicina .....	12
6.4 Preparación de las estructuras para los cálculos de la energía electrostática para el sistema GlyR/glicina.....	13
6.5 Contribución no electrostática o no polar a la energía libre de unión para GlyR/glicina.....	13
7. RESULTADOS.....	14
7.1 Modos de interacción de las isoformas de GlyR/glicina.....	14
7.2 Comparación de root-mean-square deviation (RMSD) del cristal con cada una de las isoformas del GlyR.....	17
7.3 Cálculos de energía de unión.....	18
7.4 Modelos $\alpha 1$ , $\alpha 2$ y $\alpha 4$ .....	20
7.5 Potenciales electrostáticos.....	22
8. CONCLUSIÓN .....	24
9. BIBLIOGRAFIA .....	25
10. ANEXOS .....	30
ANEXO 1 .....	31
ANEXO 2 .....	32
ANEXO 3 .....	33
ANEXO 4 .....	34
ANEXO 5 .....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelos de GlyR.....	3
<b>Figura 2.</b> Dominios del GlyR: extracelular, transversal e intracelular. ....	4
<b>Figura 3.</b> A) GlyR $\alpha 3$ con cinco glicinas unidas (ID PDB 5VDH). B) Mapa de interacción 2D del monómero A de la estructura cristalográfica $\alpha 3$ (ID PDB 5VDH) .....	4
<b>Figura 4.</b> Representación del modo de interacción del receptor GlyR/glicina. ....	7
<b>Figura 5.</b> Modos de interacción de acoplamiento molecular de la estructura 5VDH cristalográfica y 5VDH minimizado con glicina.....	14
<b>Figura 6.</b> Modo de interacción de acoplamiento molecular de los complejos de las isoformas de GlyR con glicina ( $\alpha 1$ , $\alpha 2$ y $\alpha 4$ ).....	15
<b>Figura 7.</b> Modo de interacción de acoplamiento molecular de los monómeros de las isoformas de GlyR con glicina más desfavorables .....	16
<b>Figura 8.</b> Estudio de RMSD.....	18
<b>Figura 9.</b> Sitio de unión del monómero A de cada isoforma.....	22

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Valores de RMSD de las isoformas $\alpha 1$ , $\alpha 2$ y $\alpha 4$ .....	17
<b>Tabla 2.</b> Valores de energía del acoplamiento molecular de los monómeros de la estructura 5VDH cristal y 5VDH minimizado con glicina a pH fisiológico.....	19
<b>Tabla 3.</b> Valores de energía del re-acoplamiento molecular de cada uno de los monómeros de la estructura 5VDH cristal y 5VDH minimizado con glicina a pH fisiológico.....	20
<b>Tabla 4.</b> Valores de energía de los modelos $\alpha 1$ , $\alpha 2$ y $\alpha 4$ con glicina a pH fisiológico.....	21

## ABREVIATURAS

$\alpha$  Alfa

**APBS** Adaptative Solver Poisson-Boltzmann

**ASA** Área de superficie accesible al solvente

$\beta$  Beta

**Cl<sup>-</sup>** Cloro

**Ec.** Ecuación

$\gamma$  Tensión superficial

**GABAARs** Receptores tipo A de ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GlyR** Receptor de glicina

**$\Delta$ ASA<sub>interfase</sub>** Diferencia de área accesible de la interfase al solvente

**$\Delta$ G<sub>u</sub>** Energía libre de Gibbs de la unión receptor GlyR/glicina

**$\Delta$ G<sub>u,coul</sub>** Energía libre de Gibbs coulombica de la unión receptor GlyR/glicina

**$\Delta$ G<sub>u,elec</sub>** Energía libre de Gibbs electrostática de la unión receptor GlyR/glicina

**$\Delta$ G<sub>u,no-elec</sub>** Energía libre de Gibbs no electrostática de la unión receptor GlyR/glicina

**$\Delta$ G<sub>u,sol</sub>** Energía libre de Gibbs de solvatación de la unión receptor GlyR/glicina

**IFN** Interferón

**IL** Interleucina

**kDa** Kilodalton

**kJ/mol** Kilojoules/molar

**NF- $\kappa$ B** Factor nuclear kappa B

**NMDA** N-metil-D-aspartato

**PDB** Protein Data Bank

**RMSD** Root mean square deviation

**SNC** Sistema Nervioso Central

**TNF- $\alpha$**  Factor de necrosis tumoral

**VMD** Visual Molecular Dynamic

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Glicina

La glicina, un aminoácido pequeño, no esencial y de estructura simple constituida por un hidrógeno como cadena lateral (Matilla *et al.*, 2002). Es considerada como un importante neurotransmisor inhibitorio del Sistema Nervioso Central (SNC), sus efectos están regulados por un receptor específico de glicina (GlyR), el cual se encuentra anclado a la membrana plasmática y asociado a canales de cloro (Cl<sup>-</sup>). (Lynch, 2004). Un segundo papel de la glicina en el SNC, adicional al de neurotransmisor inhibitorio, es el de neuromodulador en vías glutamatérgicas excitadoras que utilizan el receptor de glutamato tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) en el que la glicina es un activador necesario tanto para la unión del glutamato como para el reciclado del receptor en la membrana plasmática (Aragón C y López Beatriz, 2009). Así mismo, es considerada como citoprotector, antioxidante y regulador de los procesos inflamatorios (Matilla *et al.*, 2002).

## 1.2 Proceso inflamatorio

La inflamación desencadena la respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica (García Barreno, 2008). La respuesta inflamatoria inicia con el reconocimiento de señales intra o 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 del sistema inmune. Esto genera la secreción de mediadores inflamatorios con función principalmente proinflamatoria, como **el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina -12 (IL-12), interferón tipo gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleucina -6 (IL-6)** (Dinarello,2000).

Durante la respuesta inflamatoria se activa una de las rutas de transducción de señales más importantes que es mediada por la activación del factor nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), esta ruta promueve la transcripción de genes que codifican citocinas proinflamatorias. La regulación en la síntesis de estas citocinas durante el

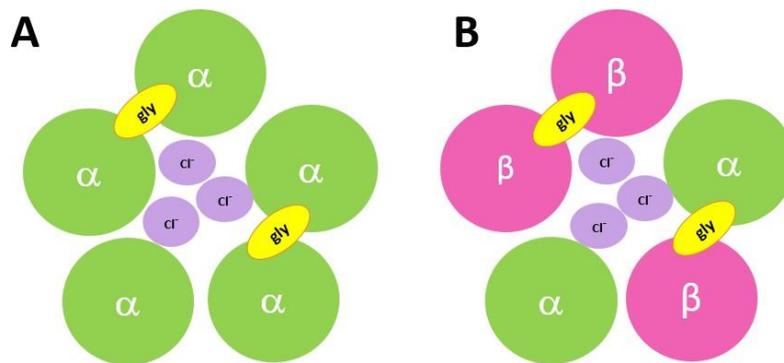
desarrollo de la inflamación ha permitido estudiar agentes que tengan la capacidad de inhibir este fenómeno, llevando al desarrollo de fármacos que son capaces de actuar a diferentes niveles. La glicina se ha usado como un blanco terapéutico debido a sus efectos antiinflamatorios regulando la secreción de citocinas (Matilla *et al.*, 2002).

Uno de los procesos que tienen lugar en la inflamación es la infiltración en los tejidos inflamados de células del sistema inmune, tales como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y adipocitos. La hipertrofia de los adipocitos que se presenta en la obesidad lleva a un aumento en la producción de estos, así como otras células presentes en el tejido adiposo (fracción estroma-vascular), de una serie de adipocinas/citocinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, entre otros. En estudios previos se ha considerado que los efectos de la glicina regulan el proceso inflamatorio ya que inhibe la fosforilación de NF- $\kappa$ B mediante el bloqueo del complejo IKK- $\alpha/\beta$ , lo cual podría explicar la regulación de citocinas proinflamatorias, así como la disminución de la resistencia a la insulina en la obesidad, que se caracteriza por un estado inflamatorio crónico y de bajo grado (Contreras, E *et al.*, 2018). Hasta el momento, no se sabe si esta regulación de citocinas proinflamatorias se da solo por la presencia de la glicina o por la interacción de la glicina con GlyR en tejido adiposo.

### **1.3 Receptor de glicina**

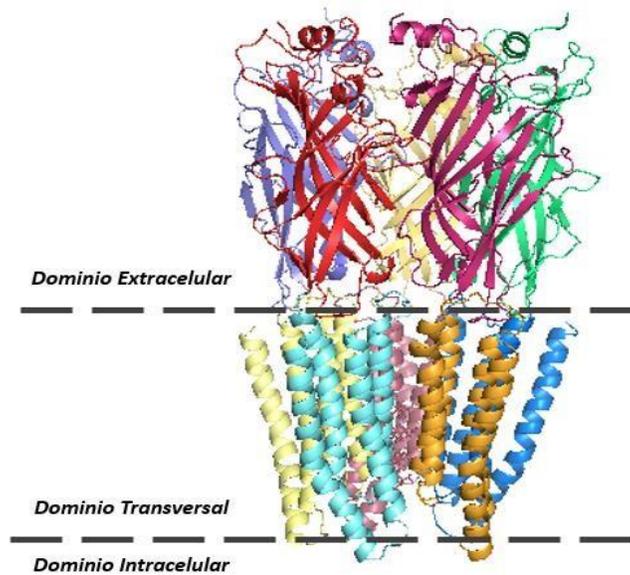
El GlyR es una proteína integral de membrana (proteína anclada a la membrana plasmática) asociada a canales de Cl<sup>-</sup> y cuando la glicina se une a su receptor ejerce su acción inhibitoria (Chatterton *et al.*, 2002; Laube *et al.*, 2002). El GlyR es un miembro de la familia de receptores de acetilcolina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

La glicina hiperpolariza la membrana plasmática por incremento de la conductancia al  $\text{Cl}^-$  (Zhong *et al.*, 2003); así, el receptor de glicina es a menudo referido como un canal de  $\text{Cl}^-$  unido o sensible a glicina. El GlyR es pentamérico y puede estar compuesto por dos tipos de subunidades, las  $\alpha$  funcionales y las  $\beta$  estructurales, revelando una estequiometría de  $2\alpha:3\beta$  (Aragón C y López Beatriz, 2009), aunque se ha observado que el canal puede estar conformado de cinco subunidades  $\alpha$ . Es importante mencionar que al momento de interactuar la glicina (color amarillo) con las subunidades  $\alpha$  o  $\beta$  se inhibe la entrada de iones  $\text{Cl}^-$  (resaltados en color lila) al interior de la célula, como se muestra en la figura 1.



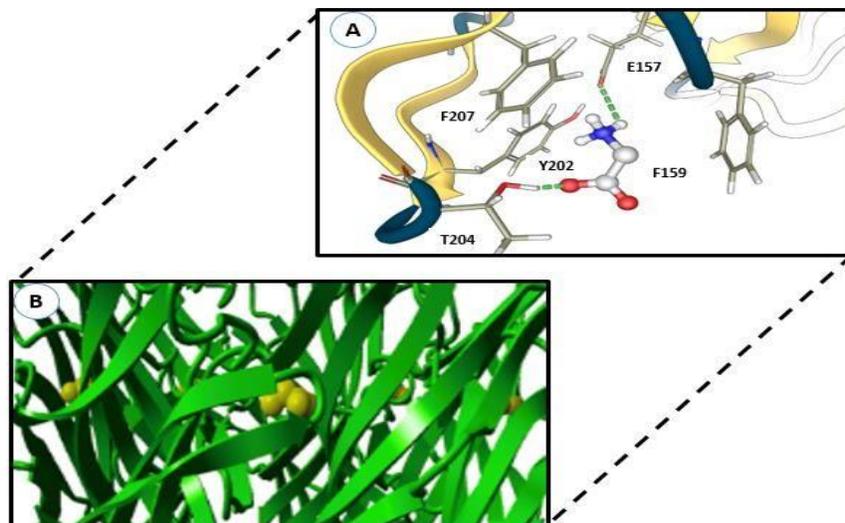
**Figura 1.** Modelos de GlyR. A) GlyR pentamérico formado por subunidades  $\alpha$ . B) GlyR pentamérico formado por dos subunidades  $\alpha$  y tres subunidades  $\beta$ .

En el Protein Data Bank (PDB) se encuentran estructuras de diversas especies, entre ellas, la estructura reportada de *Homo sapiens* que es la isoforma  $\alpha 3$  del GlyR (Figura 2), donde cada monómero está unido a una glicina (ID PDB 5VDH) (Huang X *et al.*, 2017). Además, se divide en tres dominios: 1) dominio extracelular con plegamiento de hoja  $\beta$  de 58 kDa, 2) dominio transversal con un plegamiento de  $\alpha$ -hélice de 48 kDa y 3) dominio intracelular de 93 kDa (Figura 2). La acción de la glicina puede ser bloqueada selectivamente por la estricnina (*alcaloide convulsivante*), que se extrae del árbol *Strychnos nuxvomica*, originario de la India (Matilla *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Dominios del GlyR: extracelular, transversal e intracelular. Figura visualizada con el programa Pymol (Schrodinger *et al.*, 2010) (ID PDB 5VDH) (Huang X *et al.*, 2017).

En la figura 3 se muestra el modo de unión de un monómero de GlyR con glicina para identificar los aminoácidos que participan en el sitio de unión de cada monómero de  $\alpha 3$ , los cuales son: E157, Phe159, Tyr202, Thr204 y Phe207.



**Figura 3.** A) Mapa de interacción 2D del monómero A de la estructura cristalográfica  $\alpha 3$  (ID PDB 5VDH) obtenida por el programa *Ligplot+* (Wallace A C *et al.*, 1996). B) GlyR  $\alpha 3$  (ID PDB 5VDH) con cinco glicinas unidas en el barril  $\beta$  del dominio extracelular con 2.85 Å de resolución (Huang X *et al.*, 2017).

Las características cinéticas de las subunidades  $\alpha$  del GlyR se han estudiado principalmente en las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , y en menor proporción en GlyRs  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ .

El registro electrofisiológico tanto en GlyRs nativos como recombinantes ha demostrado que este receptor tiene propiedades farmacológicas y cinéticas específicas, dependiendo de las isoformas que lo constituyen. En las diferentes regiones del SNC en donde se expresa el GlyR se sabe que los receptores  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  tienen propiedades cinéticas rápidas, mientras que los GlyRs  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$  presentan respuestas sostenidas (Velázquez F. M *et al.*, 2012).

Actualmente, no hay estudios que describan el mecanismo de acción de la glicina en la interacción con GlyR en adipocitos (células no neuronales). Por lo anterior, con la finalidad de complementar los estudios ya reportados de la glicina y su receptor, en este trabajo se realizaron modelos de la interacción de las diferentes isoformas del GlyR ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ ) con glicina por estudios de acoplamiento molecular. Estos modelos permitieron evaluar la energía de unión ( $\Delta G_u$ ) y determinar en qué isoforma la glicina presentó mayor afinidad para comprender su mecanismo de señalización durante los procesos inflamatorios y con ello resolver problemas de enfermedades crónico-degenerativas como la obesidad.

#### **1.4 Interacciones en el reconocimiento molecular receptor GlyR/glicina**

La glicina es un aminoácido considerado como neurotransmisor en el SNC, asociada a GlyR que se encuentra anclado a la membrana plasmática y cuando la glicina se une a su receptor ejerce su acción inhibitoria (Laube *et al.*, 2002). La glicina hiperpolariza la membrana plasmática por incremento de la conductancia al  $\text{Cl}^-$  (Zhong *et al.*, 2003). Con la producción de estímulos externos, se produce un influjo de calcio libre extracelular a través de canales que son dependientes de voltaje, la entrada de calcio al interior de la membrana es impedida debido al estado de hiperpolarización de la membrana plasmática creado por la interacción de la glicina con su receptor. La interacción de glicina con GlyR genera la formación de enlaces no covalentes entre glicina y su sitio de unión. Estas interacciones pueden ser de tipo electrostáticas, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Serratos I.N., 2011).

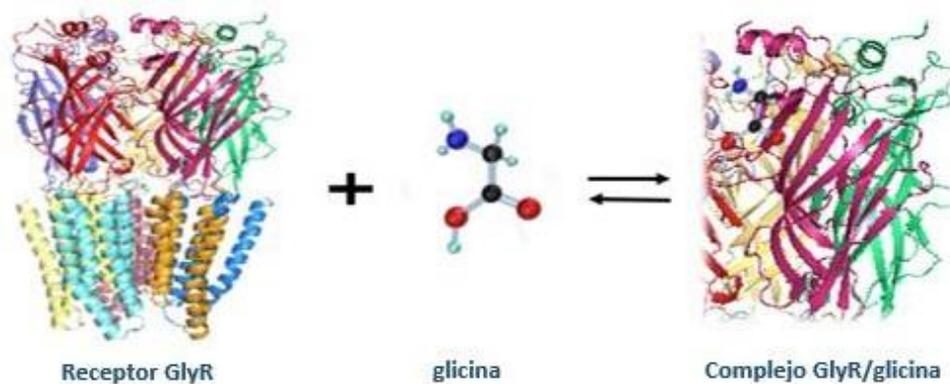
#### 1.4.1 Tipos de interacciones no covalentes

- a) **Interacciones electrostáticas:** Estas interacciones son importantes en sistemas biológicos, tal es el caso del receptor de glicina GlyR/glicina debido a que son de mayor alcance y la fuerza con la que interactúan dependen de las orientaciones que puedan adoptar (Dill KA y Bromberg S., 2003)
- b) **Enlaces de hidrógeno:** Este tipo de interacciones tienen un papel muy importante en las propiedades biológicas de macromoléculas como proteínas, mayormente en el mantenimiento de unión, estructural y cambios conformacionales (Dill KA y Bromberg S., 2003; Serratos I.N., 2011). En el caso de la glicina y su receptor, estas interacciones se efectúan entre el átomo del nitrógeno del grupo  $\text{NH}_3^+$  de la glicina con el oxígeno del glutámico del GlyR.
- c) **Interacciones de van der Waals:** Estas interacciones son débiles, con ellas se puede obtener información estructural de interacción de receptores, debido a que participan dos tipos de energía: energía de repulsión y energía de atracción entre moléculas distintas (Karshikoff A., 2006; Roth C. M *et al.*, 1996).
- d) **Interacciones hidrofóbicas:** Este tipo de interacción ha resultado importante en ambientes acuosos, tales como el plegamiento de proteínas o la interacción receptor-ligando y hace referencia al rechazo de ligandos o moléculas no polares en soluciones acuosas. La hidrofobicidad se refiere a la eliminación de solutos no polares al agua tras la adición a dichos solventes (Karshikoff A., 2006).

Este tipo de interacciones son las responsables de la afinidad cuando se origina un complejo, tal es el caso de la glicina al unirse al receptor GlyR, a través del cual ejerce su acción inhibidora en la respuesta inflamatoria.

### 1.5 Propiedades termodinámicas en la unión del receptor GlyR/glicina

Los parámetros termodinámicos impulsan el proceso de unión y en ella influyen principalmente interacciones de tipo no covalentes. La afinidad o constante de unión ( $K_u$ ) refleja los efectos de las interacciones de tipo no covalentes en el reconocimiento molecular entre un receptor y su ligando como el caso del receptor GlyR/glicina (Receptor GlyR+glicina  $\rightleftharpoons$  Receptor GlyR/glicina) como se describe a continuación:



**Esta interacción se describe a través de la siguiente constante de unión:**

$$K_u = \frac{[\text{Receptor GlyR/glicina}]}{[\text{Receptor GlyR}][\text{glicina}]} \quad \text{Ec (1.1)}$$

**Figura 4.** Representación del modo de interacción del receptor GlyR/glicina. También se muestra la ecuación de  $K_u$  al formarse dicho complejo.

Determinar experimentalmente la constante de unión y, a su vez, el  $\Delta G_u$  permitirá conocer la fuerza de interacción con la que se une la glicina a su receptor GlyR a través de la siguiente ecuación:

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u \quad (1.2)$$

El  $\Delta G_u$  se conforma de dos componentes, el entálpico ( $\Delta H_u$ ) y el entrópico ( $\Delta S_u$ ), los cuales dan información sobre la naturaleza de las interacciones involucradas:

$$\Delta G_u = \Delta H_u - T\Delta S_u \quad (1.3)$$

Los parámetros termodinámicos controlan el proceso de unión como el  $\Delta G_u$  y sus dos componentes ( $\Delta H_u$  y  $\Delta S_u$ ). En la energía libre de unión, el término entrópico y entálpico se pueden determinar experimental y computacionalmente. Sin embargo,

se ha reportado en la literatura que el parámetro  $\Delta G_u$  determinado computacionalmente presenta una mayor contribución a la unión respecto al  $\Delta H_u$  y  $\Delta S_u$  (Perozzo R *et al.*, 2004; Viniegra M y Serratos I.N, 2020).

Con base en lo anterior, en este proyecto se determinó el  $\Delta G_u$  computacional debido a que requiere menos tiempo de cómputo y además proporciona mayor información sobre los modos de interacción que se pueden presentar en el sistema de interés. Para el desarrollo de este trabajo se estudió la interacción del GlyR ya que juega un papel importante en la vía de señalización TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B. Es de suma importancia estudiar las formas de interacción de la glicina en unión a su receptor así como con sus diferentes isoformas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ ), lo que permitirá determinar el  $\Delta G_u$  a partir de la ecuación de Poisson-Boltzmann, cuantificando la contribución electrostática y no electrostática a la unión; y establecer en cuál de sus diferentes isoformas presenta una mejor afinidad. Esto permitirá, comprender parte del mecanismo de acción de glicina en los procesos inflamatorios.

## **2. ANTECEDENTES**

La identidad de la glicina como un neurotransmisor inhibitor fue originalmente propuesta por Aprison *et al.*, 1968 y Davidoff *et al.* 1969, quienes describieron detalladamente la distribución de la glicina a través del SNC. Sin embargo, estudios recientes sugieren que puede tener otras funciones fisiológicas ya que se encuentran distribuidos en otros tejidos.

En los espermatozoides la activación de GlyRs y de receptores de tipo A del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (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  $\text{Cl}^-$ , 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 y col., 1998). Las evidencias recientes sugieren la presencia de las isoformas GlyR  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  y  $\beta$  en células de Kupffer (Wheeler *et al.*, 2000). Así mismo, se ha descrito que, en células de Kupffer, macrófagos, leucocitos y neutrófilos, GlyR puede parcialmente mediar los efectos antiinflamatorios de la glicina asociado con la reducción en la concentración de calcio, inducido por lipopolisacáridos (Froh *et al.*, 2002).

Se considera que la glicina es un aminoácido que funciona como un nutriente antioxidante y protector celular por unión a su receptor y que su uso representa una de las alternativas que busca aminorar el proceso inflamatorio debido a sus propiedades antiinflamatorias tanto *in vivo* como *in vitro* (Alarcon-Aguilar *et al.*, 2010; Garcia-Macedo *et al.*, 2008). Este proceso inflamatorio se caracteriza por alteraciones en la respuesta inmune y la generación de señales para la síntesis de mediadores inflamatorios (Medzhitov, 2008; Recasens *et al.*, 2004).

En estudios previos se ha reportado que la glicina reprime la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 en células de Kupffer, estimulando la respuesta antiinflamatoria por el aumento de Interleucina-10 (IL-10). También, la glicina bloquea el proceso inflamatorio sistémico que se origina en una amplia variedad de estados patológicos, tales como shock hemorrágico, trauma, quemaduras, procesos de isquemia/reperfusión y sepsis, debido a la actividad de macrófagos que liberan mediadores inflamatorios como eicosanoides, los cuales desempeñan un importante papel en el proceso inflamatorio progresivo (Matilla *et al.*, 2002). Por lo que, se considera que la glicina podría ser de gran utilidad en diversos trastornos inflamatorios (Contreras E, 2018).

También se ha reportado una posible participación del GlyR, cuya interacción con la glicina podría resultar en una disminución de la fosforilación de NF- $\kappa$ B estimulada por TNF- $\alpha$  por lo tanto, GlyR podría estar participando, en la inhibición de la ruta de señalización de TNF- $\alpha$  y NF- $\kappa$ B (Contreras E, 2018). 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 y macrófagos. Esta interacción promueve el aumento del flujo de iones de Cl<sup>-</sup>,

generando la 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 and Lynch, 2007).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El proceso inflamatorio comienza con el reconocimiento de señales, que pueden ser de origen infeccioso, por traumatismo o situaciones fisiopatológicas, lo que ocasiona la activación celular y la síntesis de proteínas, modificando la respuesta efectora de las células inmunitarias. Durante el proceso inflamatorio se activa la vía de señalización de TNF- $\alpha$  y a su vez NF- $\kappa$ B por medio de una cascada de fosforilaciones. Esta proteína estimula la transcripción de genes para la síntesis de citocinas, que dan origen a varias reacciones de la respuesta inmune.

En estudios anteriores se ha utilizado glicina, y se ha observado que este aminoácido es capaz de inhibir dichos procesos inflamatorios, aunque aún no existen evidencias que describan que tipo de GlyR se encuentra presente en el adipocito. En ese mismo sentido, en este trabajo se modelaron computacionalmente las diferentes isoformas del GlyR ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 y  $\alpha$ 4) para conocer sus modos de interacción de cada una de ellas y su energía de unión. Esto permitirá comprender su mecanismo de señalización en la respuesta inflamatoria, resolviendo problemas de enfermedades crónico-degenerativas como la obesidad.

### **4. HIPÓTESIS**

Si la glicina posee carga negativa y positiva, posiblemente, se unirá con gran afinidad a GlyR, así como a sus diferentes isoformas, estableciendo un mayor número de interacciones lo que permitirá describir parte de su mecanismo de acción durante los procesos inflamatorios.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel que juega la glicina en la unión con las diferentes isoformas del GlyR para conocer los tipos de interacción que se establecen en el reconocimiento molecular.

### 5.1 *Objetivos Particulares*

- Evaluar el  $\Delta G_u$  de la glicina en el sitio de unión de las diferentes isoformas de GlyR para conocer su comportamiento de interacción por estudios computacionales.
- Comparar los valores de energía entre las isoformas para conocer la afinidad y su relación con la expresión y mecanismo de acción de cada una de ellas.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 *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 una búsqueda exhaustiva en el PDB y se descargó la estructura cristalográfica reportada de  $\alpha 3$  de *Homo sapiens* (ID PDB 5VDH)(Huang X *et al.*, 2017). Posteriormente, 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  $\alpha 3$ .

### 6.2. *Estudios de acoplamiento molecular*

Para llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular de cada una de las estructuras se utilizó el programa *PyRx Virtual Screen Tool* (Dallakyan *et al.*, 2015). Durante la interacción de GlyR/glicina se obtuvieron aproximadamente 100 poses de todas las estructuras. En el caso de la estructura  $\alpha 3$  (minimizada) se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular considerando los aminoácidos presentes en el sitio de unión: E157, Phe159, Tyr202, Thr204, Phe207 como se mostraron en la figura 4. Afortunadamente, este sitio de unión fue conservado en los modelos por

homología, sin embargo, la numeración fue diferente en cada isoforma ya que depende de la secuencia de cada una. 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 confórmeros de cada monómero que conforman el canal de glicina (monómeros A, B, C, D y E) bajo criterios energéticos y geométricos.

### **6.3 Cálculos de energía libre de unión GlyR/glicina**

Para los cálculos de energía de unión, se utilizó la metodología de Nathan Baker (Baker *et al.*, 2001), la cual consiste en evaluar las contribuciones de tipo electrostático y no electrostático. Cabe mencionar que esta metodología ha sido utilizada y publicada por el grupo de investigación de la Dra. Iris N. Serratos Álvarez en diversos sistemas (Serratos I.N *et al.*, 2011; Martínez H. J.C *et al.*, 2019; Serratos I.N *et al.*, 2019).

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:

$$\Delta G_U = \Delta G_{elec} + \Delta G_{no-elec} \quad \text{Ec. (6.1)}$$

y a su vez

$$\Delta G_{elec} = \Delta G_{solv} + \Delta G_{coul} \quad \text{Ec. (6.2)}$$

Entonces, sustituyendo la Ec. 6.2 en la Ec. 6.1 se tiene:

$$\Delta G_U = \Delta G_{solv} + \Delta G_{coul} + \Delta G_{no-elec} \quad \text{Ec. (6.3)}$$

Donde el  $\Delta G_U$  es la energía de unión y está en función de la energía electrostática,  $\Delta G_{elec}$ , y de la energía no electrostática,  $\Delta G_{no-elec}$ . A su vez el  $\Delta G_{elec}$  está en función de la energía de solvatación  $\Delta G_{solv}$  (que es la energía necesaria para retirar el solvente del sitio activo para que se una la glicina a su receptor) y de la energía

coulómbica,  $\Delta G_{coul}$  (la energía de interacción entre las cargas del GlyR y las cargas de la glicina) (Serratos I.N, 2011).

#### **6.4 Preparación de las estructuras para los cálculos de la energía electrostática para el sistema GlyR/glicina**

Con base en lo anterior, los mejores confórmers 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 (Baker *et al.*, 2001). Los archivos de salida del PDB2PQR (Dolinsky *et al.*, 2004) tuvieron un formato similar al PDB, ya que incorporaron 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).

#### **6.5 Contribución no electrostática o no polar a la energía libre de unión para GlyR/glicina**

La contribución al  $\Delta G_u$  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 ( $\gamma$ ) con un valor de  $0.021 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  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:

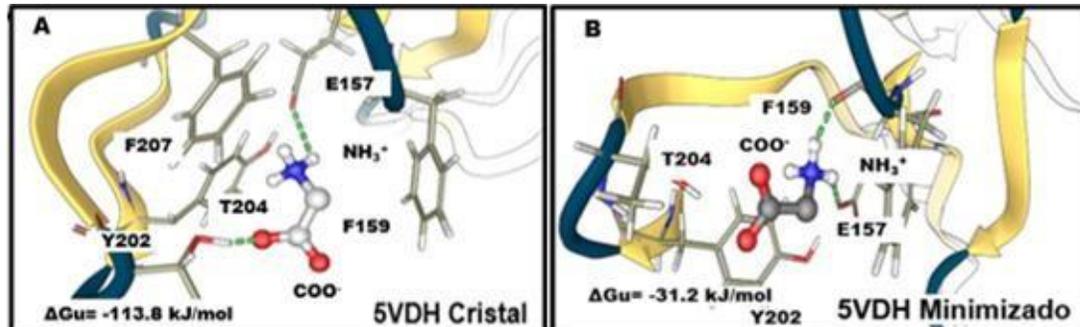
$$\Delta G_{no-elec} = \gamma (ASA_{GlyR-glicina} - ASA_{GlyR} - ASA_{glicina}) \quad \text{Ec. (6.4)}$$

Con los resultados anteriores, es posible estimar el valor de la energía libre de unión mediante la Ec. 6.1.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Modos de interacción de las isoformas de GlyR/glicina

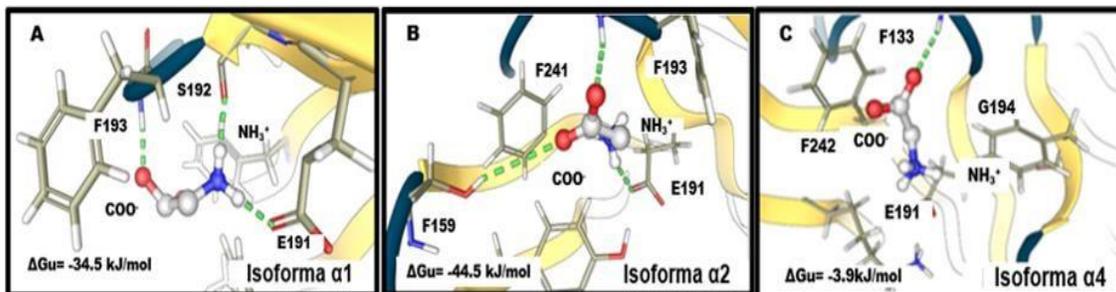
A continuación, se muestran los modos de interacción de la estructura 5VDH cristalográfica con glicina y también 5VDH minimizado con glicina (Figura 5).



**Figura 5.** Modos de interacción de acoplamiento molecular. A) Estructura 5VDH cristalográfica con glicina. B) Estructura 5VDH minimizado con glicina. Las líneas punteadas en color verde representan los enlaces de hidrógeno formados por la unión GlyR/glicina. Figura visualizada con el software Maestro Schödingen Company, 2019.

En la figura 5A correspondiente a la estructura 5VDH cristalográfica con glicina se puede observar que se establecieron dos enlaces de hidrógeno, el primero con el grupo NH<sub>3</sub><sup>+</sup> de la glicina y los oxígenos de la cadena lateral del aminoácido E157 y, el segundo enlace de hidrógeno con el grupo COO<sup>-</sup> de la glicina y las cadenas laterales del aminoácido T204. Este tipo de interacciones son muy fuertes por lo que se obtuvo un  $\Delta G_u = -113.8$  kJ/mol. Posteriormente, a dicha estructura se le realizó una minimización, esto quiere decir que se le agregó movimiento a cada átomo que constituye el GlyR, observando que, en el panel B se conservó la interacción por enlace de hidrógeno con el grupo NH<sub>3</sub><sup>+</sup> de la glicina y los oxígenos de la cadena lateral del aminoácido E157. Se estableció un segundo enlace de hidrógeno con el grupo NH<sub>3</sub><sup>+</sup> de la glicina y los oxígenos de la cadena principal del aminoácido F159, obteniendo un  $\Delta G_u = -31.2$  kJ/mol, el cual disminuyó ligeramente con respecto al valor de energía de la estructura 5VDH cristal. Debido a que se perdió la interacción con el aminoácido T204, siendo el  $\Delta G_u$  sensible a movimientos e interacciones.

En la figura 6 se muestran los modos de interacción de las isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$  con glicina.



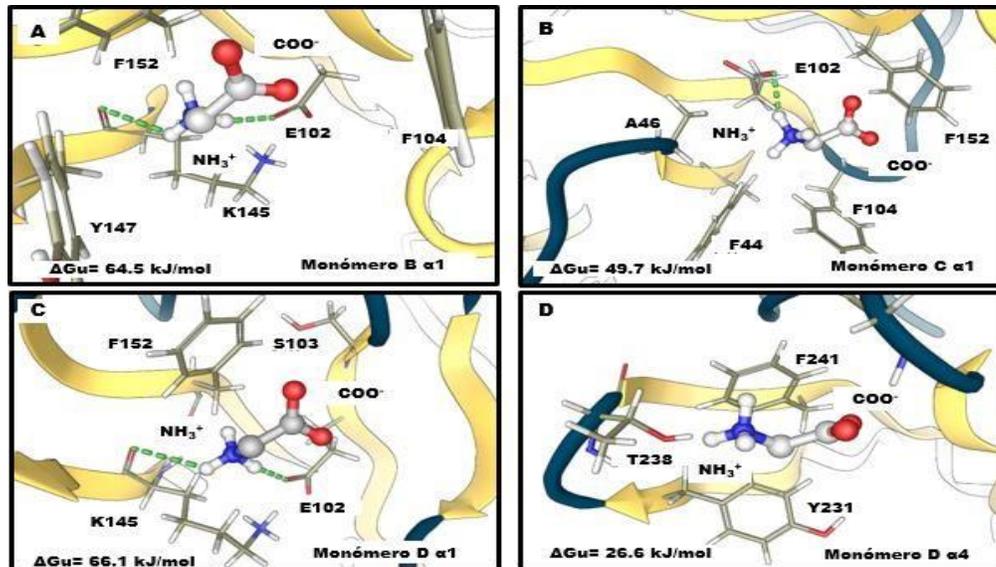
**Figura 6.** Modo de interacción de acoplamiento molecular de los complejos de las isoformas de GlyR con glicina. A) Monómero A, isoforma  $\alpha 1$ , B) Monómero A, isoforma  $\alpha 2$  y C) Monómero A, isoforma  $\alpha 4$ . Las líneas punteadas en color verde representan los enlaces de hidrógeno formados por la unión GlyR/glicina. Figura visualizada con el software Maestro Schödinger Company, 2019.

En el mapa de interacción de la isoforma  $\alpha 1$ , se formó un enlace de hidrógeno entre el grupo  $\text{COO}^-$  de la cadena lateral del E191 y el grupo  $\text{NH}_3^+$  de la glicina. De igual forma, se estableció un segundo enlace de hidrógeno en el grupo  $\text{COO}^-$  de la cadena principal del aminoácido S192 con el grupo  $\text{NH}_3^+$  de la glicina. Finalmente, se formó un tercer enlace de hidrógeno entre el oxígeno de la cadena principal del F193 interactuando en el grupo  $\text{COO}^-$  de la glicina (Figura 6A).

En la figura 6B también se estableció un enlace de hidrógeno entre el grupo  $\text{NH}_3^+$  de la glicina con el grupo  $\text{COO}^-$  de la cadena lateral del aminoácido E191. También se formó un segundo enlace de hidrógeno en el oxígeno de la cadena principal del aminoácido F193 y el grupo  $\text{COO}^-$  de la glicina. Asimismo, un tercer enlace de hidrógeno entre la cadena principal del aminoácido F159 y el grupo  $\text{COO}^-$  de la glicina. En la isoforma  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  se conservó la interacción con el grupo  $\text{NH}_3^+$  de la glicina y la cadena lateral del aminoácido E191 misma que se observó en la estructura cristalográfica, las cuales mantienen una interacción fuerte en la unión de la glicina con su receptor.

Finalmente, en la figura 6C se puede observar el modo de interacción de la isoforma  $\alpha 4$  donde se estableció un enlace de hidrógeno con el grupo  $\text{COO}^-$  de la glicina y los oxígenos de la cadena principal del aminoácido F133, generando un tipo de interacción débil y obteniendo un  $\Delta G_u = -3.9 \text{ kJ/mol}$ . Por lo tanto, la isoforma  $\alpha 4$  fue menos favorable con respecto a los valores de  $\Delta G_u$  obtenidos en las isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y en la estructura 5VDH minimizada.

Por otro lado, se muestran los mapas de interacción de los complejos menos favorables del receptor de glicina y sus isoformas, donde se puede apreciar que no se establecieron enlaces de hidrógeno en las cadenas laterales de los aminoácidos vecinos a la glicina (Figura 7).



**Figura 7.** Modo de interacción de acoplamiento molecular de los monómeros de las isoformas de GlyR con glicina más desfavorables. Panel A, B y C correspondientes al monómero B, C y D de la isoforma  $\alpha 1$ . Panel D correspondiente al monómero D de la isoforma  $\alpha 4$ . Las líneas punteadas en color verde representan los enlaces de hidrógeno formados por la unión GlyR/glicina. Figura visualizada con el software Maestro Schödingler Company, 2019.

En el panel A, B y C de la figura 7 se muestran los monómeros (B, C y D respectivamente) del modelo  $\alpha 1$ , los cuales presentaron interacciones desfavorables. Esto debido a que se establecieron enlaces de hidrógeno en las cadenas principales de los aminoácidos E102 y K145 (panel A correspondiente al monómero B).

En la figura 7B (correspondiente al monómero C del modelo  $\alpha 1$ ), se formó un enlace de hidrógeno con la cadena principal del E102 y el grupo  $\text{NH}_3^+$  de la glicina. De igual forma en la figura 7C (correspondiente al monómero D del modelo  $\alpha 1$ ) se establecieron dos enlaces de hidrógeno entre las cadenas principales de los aminoácidos E102 y K145 con el grupo  $\text{NH}_3^+$  de la glicina.

Finalmente, en la figura 7D, que corresponde al monómero D del modelo  $\alpha 2$  se observó que no se establecieron enlaces de hidrógeno y tampoco interacciones electrostáticas, lo cual provocó una disminución en el  $\Delta G_u$ , ver tabla 4.

## **7.2 Comparación de root-mean-square deviation (RMSD) del cristal con cada una de las isoformas del GlyR**

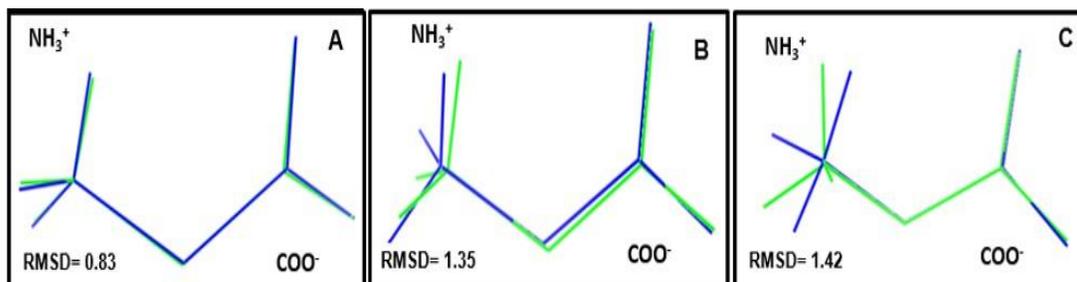
Es importante mencionar que la estructura 5VDH cristalográfica obtenida del PDB se encuentra acomplejada con la glicina, esto es de gran importancia ya que permitió realizar el modelado por homología de las demás isoformas del GlyR y conocer su sitio de unión. Para validar la técnica de acoplamiento molecular se acopló la glicina del cristal con la estructura de manera separada. Este mismo procedimiento se realizó en cada monómero de la estructura 5VDH minimizada con glicina. Una vez establecidas las condiciones, se llevaron a cabo los estudios de acoplamiento molecular en cada una de las isoformas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$ ) con glicina. Tanto a los modelos obtenidos con la estructura 5VDH minimizada y las isoformas acomplejadas se les determinó el RMSD, el cual fue menor a 2 Å en todos los casos (Tabla 1).

En la tabla 1, se muestran los valores de RMSD de cada modelo:

**Tabla 1.** Valores de RMSD de la glicina unida a las diferentes isoformas de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$  comparada con la glicina unida a la estructura 5VDH minimizada.

Modelos	Monómero A	Monómero B	Monómero C	Monómero D	Monómero E
5VDH mini					
$\alpha 1$	1.35	0.83	1.36	0.83	0.85
$\alpha 2$	0.83	1.35	0.83	0.83	1.35
$\alpha 4$	0.84	1.42	1.35	1.36	1.36

A continuación, se muestran los traslapes de la glicina derivado de la estructura 5VDH minimizada con cada uno de los modelos de las diferentes isoformas (Figura 8).



**Figura 8.** El estudio de RMSD mostró valores menores de 1.4 Å, esto indica que la técnica de acoplamiento molecular se realizó de manera correcta ya que siempre deben arrojar valores menores a 2 Å. A) Traslape de la glicina de la estructura 5VDH minimizada (color azul) con la glicina del modelo α1, (color verde). B) Traslape de la glicina del cristal 5VDH minimizada (color azul) con la glicina del modelo α2 (color verde). C) Traslape de la glicina de la estructura 5VDH minimizada (color azul) con la glicina del modelo α4 (color verde).

### 7.3 Cálculos de energía de unión

Como se mencionó en el apartado anterior se realizó la técnica de acoplamiento molecular a la estructura cristalográfica α3 de *Homo sapiens* obtenida del PDB (ID PDB 5VDH). Posteriormente, a dicha estructura se le realizó una minimización con la finalidad de agregarle movimiento a cada átomo que conforma el GlyR. Finalmente se realizó un re-acoplamiento molecular en ambas estructuras con el fin de validar la técnica utilizada para cada una de ellas.

A todos los complejos obtenidos del acoplamiento molecular se les determinó la energía de unión a partir de la ecuación 6.1 de la metodología descrita en el apartado anterior. En la tabla 2 se muestran los valores correspondientes al  $\Delta G_u$  para cada monómero de la estructura 5VDH cristal y 5VDH minimizada de α3.

**Tabla 2.** Valores de energía del acoplamiento molecular de los monómeros de la estructura 5VDH cristal y 5VDH minimizado con glicina a pH fisiológico. Las energías se determinaron con los programas de APBS (Baker *et al.*, 2001) y VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

<b>5VDH cristal</b>	$\Delta G_{solv}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{coul}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{no-elec}$ (kJ/mol)	$^*\Delta G_u$ (kJ/mol)
<b>Monómero A/glicina</b>	-8.5	-110.3	-5	-123.9
<b>Monómero B/glicina</b>	4	-105.8	-5	-106.9
<b>Monómero C/glicina</b>	-1.8	-111.6	-5.3	-118.7
<b>Monómero D/glicina</b>	3.7	-102.4	-5.1	-103.8
<b>Monómero E/glicina</b>	-2.5	-108.8	-5.3	-116.8
<b>5VDH minimizado</b>	$\Delta G_{solv}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{coul}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{no-elec}$ (kJ/mol)	$^*\Delta G_u$ (kJ/mol)
<b>Monómero A/glicina</b>	0.4	-100.4	-5.0	-105.1
<b>Monómero B/glicina</b>	7.8	-64.9	-5.0	-62.0
<b>Monómero C/glicina</b>	8.7	-70	-5.3	-66.6
<b>Monómero D/glicina</b>	8.4	-64.6	-5.1	-61.4
<b>Monómero E/glicina</b>	6.2	-71.1	-5.3	-70.2

$$^*\Delta G_u = \Delta G_{solv} + \Delta G_{coul} + \Delta G_{no-elec}$$

En la tabla anterior se observa que los monómeros de la estructura 5VDH cristalográfica presentaron un  $\Delta G_u$  de -124 a -105 kJ/mol (resaltados en color rosa). Estos valores se deben a que los átomos de esta estructura se encuentran muy rígidos, mientras que los valores de  $\Delta G_u$  de 5VDH minimizada (resaltados en color gris) disminuyeron ligeramente con respecto a la estructura 5VDH cristalográfica, ya que en esta estructura los átomos que la conforman se encuentran relajados. Ambas estructuras presentaron uniones conducidas por interacciones electrostáticas principalmente, y en menor proporción interacciones no electrostáticas.

En la siguiente tabla se muestran los valores que se obtuvieron de la validación que se realizó por re-acoplamiento molecular de las estructuras 5VDH cristalográfica y 5VDH minimizada, esto con el fin de comprobar que la técnica de acoplamiento molecular se haya realizado de manera correcta.

**Tabla 3.** Valores de energía del re-acoplamiento molecular de cada uno de los monómeros de la estructura 5VDH cristal y 5VDH minimizado con glicina a pH fisiológico. Las energías se determinaron con los programas de APBS (Baker *et al.*, 2001) y VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

5VDH cristal (re-acoplamiento)	$\Delta G_{solv}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{coul}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{no-elec}$ (kJ/mol)	* $\Delta G_u$ (kJ/mol)
Monómero A/glicina	-1.7	-107	-5.1	-113.8
Monómero B/glicina	7.9	-106.4	-5	-103.4
Monómero C/glicina	5.6	-107	-5.1	-106.6
Monómero D/glicina	14.2	-100.4	-5	-91.2
Monómero E/glicina	8.4	-103.6	-5.3	-100.4
5VDH minimizado (re-acoplamiento)	$\Delta G_{solv}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{coul}$ (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	-5.8	-9.9
Monómero D/glicina	20.5	-26.2	-5.4	-11.2
Monómero E/glicina	7.9	-31.6	-6.1	-29.8

$$*\Delta G_u = \Delta G_{solv} + \Delta G_{coul} + \Delta G_{no-elec}$$

En la tabla 3 se pueden mostrar los valores correspondientes del re-acoplamiento molecular para cada monómero con su glicina (monómero/glicina) donde se observó que los valores de  $\Delta G_u$  de cada monómero de la estructura 5VDH minimizada (resaltados en color gris) disminuyeron aproximadamente en un 50% con respecto a los valores obtenidos en la estructura 5VDH cristalográfica (resaltados en color rosa). Esto puede deberse a que se perdió la interacción por enlace de hidrógeno entre el grupo  $\text{COO}^-$  de la glicina y la cadena lateral del aminoácido T204.

#### 7.4 Modelos $\alpha 1$ , $\alpha 2$ y $\alpha 4$

Afortunadamente existe la estructura cristalográfica de  $\alpha 3$  de *Homo sapiens* (ID PDB 5VDH) (Huang X *et al.*, 2017), lo que permitió llevar a cabo estudios de modelado por homología del canal de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$  para determinar el  $\Delta G_u$ . A continuación, se muestran los valores del  $\Delta G_u$  de los cinco monómeros de estas isoformas:

**Tabla 4.** Valores de energía de los modelos  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$  con glicina a pH fisiológico. Resaltando en color morado (modelo  $\alpha 1$ ) y color rosa (modelo  $\alpha 2$ ) los monómeros con energías más favorables de cada subunidad. Las energías se determinaron con los programas de APBS (Baker *et al.*, 2001) y VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

Modelo $\alpha 1$	$\Delta G_{solv}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{coul}$ (kJ/mol)	$\Delta G_{no-elec}$ (kJ/mol)	$^*\Delta G_u$ (kJ/mol)
Monómero A/glicina	14.8	-43.6	-5.7	-34.5
Monómero B/glicina	44.2	26	-5.7	64.5
Monómero C/glicina	42.6	12.7	-5.6	49.7
Monómero D/glicina	46	25.9	-5.7	66.1
Monómero E/glicina	16.7	-43.9	-5.7	-32.9
<b>Modelo <math>\alpha 2</math></b>				
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	-20.9	-4.9	-16
Monómero D/glicina	25.4	7	-5.7	26.7
Monómero E/glicina	27.4	-7.9	-5	14.6
<b>Modelo <math>\alpha 4</math></b>				
Monómero A/glicina	18.6	-16.9	-5.5	-3.9
Monómero B/glicina	17.8	-17.4	-5.5	-5.2
Monómero C/glicina	20.7	-15.4	-5.6	-0.3
Monómero D/glicina	21.2	-10.9	-5.4	4.9
Monómero E/glicina	18.6	-17.1	-5.5	-4

$$^*\Delta G_u = \Delta G_{solv} + \Delta G_{coul} + \Delta G_{no-elec}$$

En la tabla anterior se muestran las contribuciones de energía de los cinco monómeros de cada isoforma ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$ ) donde se observó que dicha energía 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 (resaltados en color morado) presentaron energía más favorable con respecto a la estructura cristalográfica de  $\alpha 3$ , esto debido a que se formaron mayores contactos. Sin embargo, estos contactos se establecieron entre las cadenas principales de los aminoácidos del sitio de unión del modelo  $\alpha 1$ . Es importante mencionar que no se establecieron contactos con las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte del sitio activo y la glicina, como sucedió con  $\alpha 3$ .

En el caso del modelo  $\alpha 2$ , los monómeros A y B (resaltados en color rosa) también presentaron energías muy favorables debido a que se conservó la interacción con

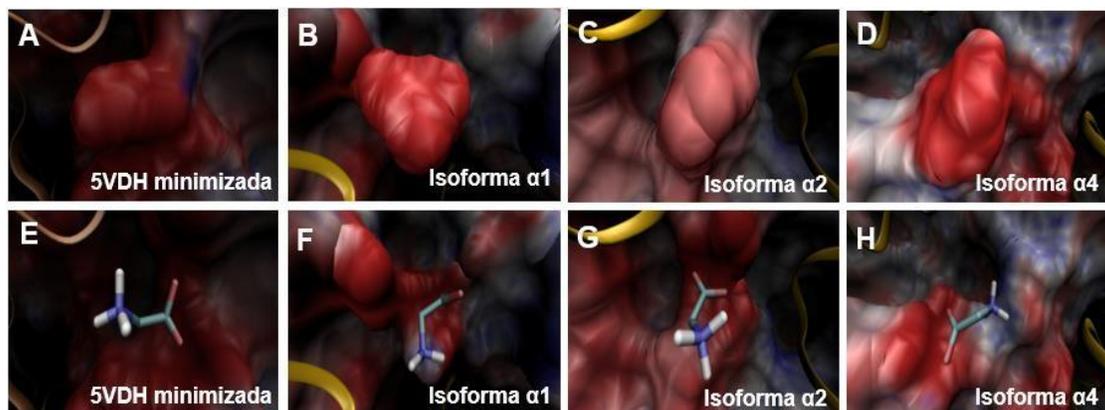
la cadena lateral del aminoácido E157 con el grupo  $\text{NH}_3^+$  de la glicina, la cual se observó en la estructura de  $\alpha 3$ . De igual manera, se establecieron uniones entre las cadenas principales de algunos aminoácidos que forman parte del sitio activo con la glicina.

Por último, en el modelo  $\alpha 4$  todos los monómeros presentaron valores de energía desfavorables respecto a los modelos de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y la estructura de  $\alpha 3$ , debido a que se establecieron interacciones por enlaces de hidrógeno con las cadenas principales de los aminoácidos E102 y K145 con el grupo  $\text{NH}_3^+$  de la glicina. El valor de  $\Delta G_u$  se calculó a partir de la Ec. (6.3), siendo el término  $\Delta G_{coul}$  el que más contribución tuvo en este sistema. En todos los casos se observó que los valores del  $\Delta G_{solv}$  fueron positivos, esto indica que la desolvatación de las moléculas individuales son desfavorables, por lo cual, se deben retirar moléculas de agua para que ocurra la unión de la glicina con su receptor.

A pesar de que los monómeros conforman el canal de glicina, su comportamiento y unión es independiente entre cada uno.

### 7.5 Potenciales electrostáticos

Finalmente, se muestran los potenciales electrostáticos de los monómeros A de cada isoforma del GlyR, ya que fueron los que presentaron mejores interacciones y valores de  $\Delta G_u$  (Figura 9).



**Figura 9.** 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  $\alpha 4$ . Sitio de unión de cada isoforma de GlyR con glicina (E-H). Los sitios de color blanco denotan la presencia de cargas neutras, los sitios de color azul indican presencia de cargas positivas y, finalmente, los sitios de color rojo, indican la presencia de cargas negativas. Figuras obtenidas del programa APBS (Baker *et al.*, 2001) y VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

La figura 9 muestra que en los sitios de unión de las diferentes isoformas del GlyR predominan las cargas negativas (color rojo) y esto es debido a que en el sitio de unión y zonas cercanas hay presencia de ácidos glutámicos y aspárticos (A-C). Por otro lado, en el panel D se muestra el sitio de unión del modelo  $\alpha 4$  con cargas negativas y contactos neutros (color blanco).

Al momento de unirse la glicina en el sitio de las diferentes isoformas del GlyR se formaron interacciones electrostáticas favorables con el glutámico que forma parte del sitio de unión del receptor, como se puede observar en los paneles E, F y G respectivamente. En el caso del panel H que corresponde a la isoforma  $\alpha 4$ , se establecieron interacciones de tipo repulsivo, ya que el grupo  $\text{COO}^-$  de la glicina esta cercano a cargas negativas del sitio de unión. Debido a que la glicina tiene una carga positiva y una carga negativa a pH fisiológico puede llegar a establecer interacciones de grupo repulsivo y de atracción.

Por consiguiente, estos resultados parecen explicar lo reportado en la literatura, la cual menciona que la isoforma  $\alpha 1$  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. Por otra parte,  $\alpha 3$  se considera la más abundante, esta presente en etapa adulta en médula espinal, así como en algunas células dendríticas. La distribución de  $\alpha 4$  permanece elusiva debido a su escasez (Aragón C y López Beatriz, 2009).

## **8. CONCLUSIÓN**

La interacción de la glicina con su receptor es favorable y son establecidas principalmente por interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno.

A pesar de que la glicina posee carga negativa y positiva, no estableció las mismas interacciones en las diferentes isoformas del GlyR.

Actualmente no hay estudios en los cuales se expliquen cómo es la interacción de las diferentes isoformas del receptor de glicina.

Es importante conocer estas interacciones lo que permitirá dilucidar el posible mecanismo de acción de la glicina y su receptor en procesos inflamatorios.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- 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. DOI: 10.1016 / j.ejphar.2008.09.047.
- Andrey Karshikoff., (2006). Non-Covalent Interactions in proteins. ISBN 1-86094-707-7, 25-129.
- Aragón R, Carmen., López C, Beatriz., (2009). Fisiopatología de la Neurotransmisión Glicinérgica, 147-176.
- Baker Na., Sept D., Holst M., McCammon JA., (2001). Electrostatic of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98:10037-10041. DOI: 10.1073 / pnas.181342398.
- Baker N. A., (2004). Poisson-Boltzmann methods for biomolecular electrostatics. *Methods Enzymol.* 383, 94-118. DOI: 10.1016/S0076-6879 (04) 83005-2.
- 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. DOI: 10.1095 / biolreprod66.1.91.
- 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. DOI: 10.1038/nature715.
- Contreras Núñez E. (2018). Regulación de la vía TNF- $\alpha$ /NF $\kappa$ B por la acción de la glicina en adipocitos. (Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana) Repositorio institucional - Universidad Autónoma Metropolitana.
- Contreras, E., Blancas G., Cruz-Miguel, 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- $\alpha$ / $\beta$  complex in the inhibition of the TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway by glycine: Possible involvement of a membrane receptor specific to adipocytes, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 120-131. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.048.
- Dallakyan S., Olson A.J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods Mol. Biol.*; 1263:243-250. DOI: 10.1007 /978-1-4939-2269-7\_19.

- Dill KA and Bromberg S. (2003). *Molecular Driving Forces: Statistical Thermodynamics in Chemistry and Biology*. Garland Science Publishing, New York. DOI: 10.4324 / 9780203809075.
- Dinarello, C.A., (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503-508. DOI: 10.1378 / cofre.118.2.503.
- 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. DOI: 10.1093 / nar / gkh381.
- Friedman R. A., Honig B. A. (1995). Free Energy Analysis of Nucleic Acid Base Stacking in Aqueous Solution. *Biophysical Journal.*, 69:1528-1535. DOI: 10.1016 / S0006-3495 (95) 80023-8.
- 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. DOI: 10.1152 / ajpgi.00503.2001.
- Garcia Barreno P. (2008). Inflamación. *Rev. R Acad. Cienc, Exac Fis. Nat (España).*,102: 91-159.
- Garcia-Macedo, R., Sanchez-Munoz, F., Almanza-Perez, J.C., Duran-Reyes, G., Alarcon-Aguilar, F., Cruz, M. (2008). Glycine increases mRNA adiponectin and diminishes pro-inflammatory adipokines expression in 3T3-L1 cells. *Eur J Pharmacol* 587, 317-321. DOI: 10.1016 / j.ejphar.2008.03.051
- Harvey, R.J., Schmieden, V., Von Holst, A., Laube, B., Rohrer, H., Betz, H., (2000). Glycine receptors containing the alpha4 subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *Eur J Neurosci* 12, 994-1001. DOI: 10.1046 / j.1460-9568.2000.00993.x.
- Huang X., Chen H. y Shaffer P.L., (2017). Crystal Structures of Human GlyR alpha 3 Bound to Ivermectin. *Structure* 25: 945-950.e2. DOI: 10.1016 / j.str.2017.04.007.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996) VMD: Visual molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics.*, 14: 33-38, 27-28. DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5

- 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. DOI: 10.1002 / jcc.20945.
- 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. DOI: 10.1016 / s0165-6147 (02) 02138-7.
- Lynch, J.W., (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev* 84, 1051-1095. DOI: 10.1152 / physrev.00042.2003.
- Martínez-Hernández JC, Serratos IN, Millán-Pacheco C, Rojo-Domínguez A, Padilla-Zúñiga J. (2019). What comparisons of natural and chimeric contacts reveal about inhibition of human cathepsins K, L and S by their prosegments. *J Mex Chem. Soc*; 63: 13-24. DOI: 10.29356/jmcs.v63i1.684.
- Matilla B., Mauriz J. L., Culebras J. M., González-Gallego J y González P., (2002). La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutrición Hospitalaria.* 17:2-9.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.
- Recasens, M., Ricart, W., Fernandez-Real, J.M., (2004). [Obesity and inflammation]. *Rev. Med Univ Navarra* 48, 49-54. DOI: 10.1038 / nature07201.
- Perozzo R, Folkers G, Scapozza L. (2004). Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. *J Recept Sig Transd.*; 24: 1-52. DOI: 10.1081 / rrs-120037896.
- Roth CM, Neal BL and Lenhoff AM (1996). Van der Waals Interactions Involving Proteins. *Biophys J.*;70: 977-987. DOI: 10.1016 / S0006-3495 (96) 79641-8.
- 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. DOI: 10.1006 / dbio.2000.9882.
- Schrodinger, LLC. (2010). El sistema de gráficos moleculares PyMOL.
- Schrödinger company (2019). Consultado el 16 de junio del 2021, <https://www.schrodinger.com/our-story>

- Serratos Álvarez, I.N. (2011). Evaluación de las interacciones electrostáticas en complejos enzima-inhibidor: Triosafosfato isomerasa con inhibidores fosofrilados. (Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana). Repositorio Institucional- Universidad Autónoma Metropolitana.
- Serratos IN, Pérez-Hernández G, Garza-Ramos G, Hernández-Arana A, González-Mondragón E, Zubillaga RA (2011). Binding thermodynamics of phosphorylated inhibitors to triosephosphate isomerase and the contribution of electrostatic interactions. *J Mol Biol*; 405:158-172. DOI: 10.1016 / j.jmb.2010.10.018.
- Serratos, I.N., Olayo, R., Millán-Pacheco, C. Morales-Corona J, Vicente-Escobar JO, Soto-Estrada AM, Córdoba-Herrera JG, Uribe O, Gómez-Quintero T, Arroyo-Ornelas MA, Godínez-Fernández R. (2019). Modeling integrin and plasma-polymerized pyrrole interactions: chemical diversity relevance for cell regeneration. *Sci Rep* 2019; 9: 7009.
- Velázquez- Flores Miguel., Salceda Rocío., (2012). El receptor postsináptico de glicina media de forma transitoria y sostenida la inhibición glicinérgica en la retina de vertebrados. *Rev Neural* 2012; 55:38-46.
- Viniegra M, Serratos I.N. (2020). Insights into Protein-Ligand Interactions: Thermodynamic Signatures. An eBook on Thermodynamics, ISBN: 978-93-87500-78-5 Pag 1-13. Editor Ken Rutherford Open Access eBooks.
- 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. DOI: 10.1002 / pro.5560050603.
- Weaver, C.D., Partridge, J.G., Yao, T.L., Moates, J.M., Magnuson, M.A., Verdoorn, T.A. (1998). Activation of glycine and glutamate receptors increases intracellular calcium in cells derived from the endocrine pancreas. *Mol Pharmacol* 54, 639-646.
- Webb, T.I., Lynch, J.W., (2007). Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des* 13, 2350-2367. DOI: 10.2174 / 138161207781368693.

- Wheeler, M., Stachlewitz, R.F., Yamashina, S., Ikejima, K., Morrow, A.L., Thurman, R.G., (2000). Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *FASEB J* 14, 476-484. DOI: 10.1096 / fasebj.14.3.476.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12, 7-8. doi: 10.1038/nmeth.3213.
- Zhang LAB (2017). I-TASSER protein structure & function predictions [Portal de servidor]. MI, US: Zhang Lab. Recuperado de <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>
- Zhong, Z., Wheeler, M.D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M., Bunzendaul, 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. DOI: 10.1097 / 00075197-200303000-00013.

## **10. ANEXOS**

Debido a la emergencia sanitaria por el virus Sars-Cov-2 (COVID-19) desafortunadamente me fue imposible llevar a cabo mi especialidad de manera experimental. Sin embargo, para desarrollar mi proyecto recurrí a aprender y utilizar herramientas computacionales, las cuales me permitieron caracterizar un sistema de unión y con ello aportar a resolver algunas incógnitas que se tenían en nuestra área de interés.

Participé en cursos en línea los cuales me ayudaron a aprender y perfeccionar las técnicas necesarias para la realización de mi proyecto. También, participé en el XII Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química, los días 25, 26 y 27 de octubre de 2021 en forma virtual, para difundir los resultados obtenidos durante este año de especialización.

Al concluir mi especialidad, comenzaré con la escritura de un segundo artículo para publicarlo en una revista indizada con carácter internacional.

## **ANEXO 1**

A continuación, se muestran las constancias de los cursos en los que participé durante el año de especialización:

Curso: Dinámica molecular

Modalidad: En línea

Expedido por: Openbiolab S. de R.L de C.V.

Duración: 20 horas.

Fecha: Diciembre 2020.

Lugar: Ciudad de México



## ANEXO 2

Curso: Biología molecular

Modalidad: En línea

Expedido por: Openbiolab S. de R.L de C.V.

Duración: 20 horas.

Fecha: Diciembre 2020.

Lugar: Ciudad de México (en línea)



### ANEXO 3

Curso: Fundamentos del sistema CRISPR-Cas.

Modalidad: En línea

Expedido por: Bionano Group

Duración: 8 horas.

Fecha: Marzo 2021.

Lugar: Ciudad de México.



## ANEXO 4

A continuación, se muestra la carta de aceptación para la participación al XII Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química, a distancia a celebrarse del 25 al 27 de octubre de 2021, por la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco.



**Martínez Mosqueda Diana Stefany**  
Contreras Núñez Érika  
Pacheco Millán César  
Vicente Escobar Jonathan Ostris  
Blancas Flores Gerardo  
Serratos Álvarez Iris Natzeilly  
**PRESENTE**

Clave del trabajo: QMS21003

A nombre del Comité Organizador, tenemos el gusto de comunicarle que su trabajo titulado:

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

ha sido **ACEPTADO** para su presentación en la modalidad de **CARTEL** dentro de las actividades del **XII CONGRESO INTERNACIONAL DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA**, a distancia, a celebrarse del **25 al 27 de octubre del 2021**, por la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco. En breve se les notificará la fecha y hora fijada en el programa.

Se les comunica que el ser aceptado su trabajo en el XII CIDIQ, no implica que éste será publicado en la *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, en su edición 2021, ya que esto depende de las evaluaciones realizadas por parte del Comité Científico Evaluador. Notificándole que para que su trabajo sea incluido en la revista, deberán ser atendidas todas las correcciones indicadas por el Comité, asegurándose de que su manuscrito cumpla con el formato establecido en la convocatoria del XII CIDIQ.

Agradeciendo enormemente el gran esfuerzo de su parte por participar activamente en este congreso y sin más por el momento, me despido con un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**"CASA ABIERTA AL TIEMPO"**

  
M. en C. María Rita Valladares Rodríguez  
Subcomité de Química de la Vida

Av. San Pablo No. 180, Col. Reynosa Tamaulipas  
Ato. Azcapotzalco, 02200 México, CdMx.  
Tel. 53 10 94 96



## ANEXO 5

A continuación, se muestra la carta de aceptación para la publicación del artículo “Interacción de las isoformas del receptor de glicina con glicina (GlyR/ glicina) por estudios computacionales en la “Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química en su edición 2021, por la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco.



**Revista Tendencias en Docencia  
e Investigación en Química  
2021**

Ciudad de México, a 23 de octubre de 2021.

**Martínez Mosqueda Diana Stefany**  
Contreras Núñez Erika  
Pacheco Millán César  
Vicente Escobar Jonathan Osiris  
Blancas Flores Gerardo  
Serratos Álvarez Iris Natzielly  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud  
**PRESENTE**

A nombre del Comité Organizador, tenemos el gusto de comunicarles, que el Comité Científico Evaluador de la *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química en su edición 2021*, ha evaluado su trabajo titulado

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

el cual ha sido **ACEPTADO** para su publicación.

Agradeciendo enormemente el gran esfuerzo de su parte, sin más por el momento, me despido con un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
“CASA ABIERTA AL TIEMPO”

M. en C. María Rita Valladares Rodríguez  
Subcomité de Química de la Vida



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

Rev. 00/11

Matrícula: 2203802226

Inferencia de las isoformas del receptor de glicina con glicina (GLYR/glicina) por estudios computacionales.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 16 del mes de diciembre del año 2021 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GERARDO BLANCAS FLORES  
DRA. IRIS NATSIELLY SERRATOS ALVAREZ  
DRA. ERIKA CONTRERAS NUÑEZ

siendo los dos primeros asesores de la alumna y lectores la tercera, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de

ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

DE: DIANA STEFANY MARTINEZ MOSQUEDA

y de acuerdo con el artículo 19 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:



DIANA STEFANY MARTINEZ MOSQUEDA

ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALBA FERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Aprobar

Así mismo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE LUIS GÓMEZ OLIVARES

ASESOR

DR. GERARDO BLANCAS FLORES

ASESOR

DRA. IRIS NATSIELLY SERRATOS ALVAREZ

LECTORA

DRA. ERIKA CONTRERAS NUÑEZ