

**MODELO DE LA ESTRUCTURA Y DEL MECANISMO DE INTERACCION CON
EL GLUTAMATO Y EL NMDA PARA EL RECEPTOR IONOTROPICO DE
GLUTAMATO SENSIBLE A N-Metil-D-Aspartato**

LUZ MIREYA CORTES URQUIJO

**Director
LEONARDO R. LAREO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN BIOLOGÍA**

**BOGOTA D.C. COLOMBIA
2002**

**MODELO DE LA ESTRUCTURA Y DEL MECANISMO DE INTERACCION CON
EL GLUTAMATO Y EL NMDA PARA EL RECEPTOR IONOTROPICO DE
GLUTAMATO SENSIBLE A N-Metil-D-Aspartato**

LUZ MIREYA CORTES URQUIJO

Trabajo de grado para optar al título
Magíster en Biología,
Énfasis Biología Molecular Computacional

Director
LEONARDO R. LAREO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN BIOLOGÍA**

**BOGOTA D.C. COLOMBIA
2002**

NOTA DE ACEPTACION

DIRECTOR

JURADO

JURADO

JURADO

DEDICATORIA

*A mis padres ALVARO CORTES
MATIZ, LUCILA URQUIJO quiénes me
enseñaron el valor del trabajo consagrado, la
perseverancia y la dedicación.*

La Pontificia Universidad Javeriana no se hace responsable por los comentarios, opiniones y conclusiones expresadas por los estudiantes. Solo se velará por que el trabajo no tenga ataques personales, y únicamente se vea en él, el anhelo de buscar la verdad y la justicia.

ARTICULO 23, RESOLUCIÓN 13, junio de 1943.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
Resumen.	
Abstract.	
1. Introducción.	16
2. Objetivos	18
3. Antecedentes.	19
4. MARCO TEORICO	23
4.1 Glutamato como neurotransmisor.	23
4.2 Receptores Ionotrópicos de glutamato.	24
4.2.1 Consideraciones generales sobre estructura de ligandos.	24
4.2.2 Conformación de los receptores y modelos estructurales.	28
4.2.2.1 Receptores No-NMDA	28
4.2.2.2 Receptores NMDA	38
4.3 Proteínas periplásmicas bacterianas.	41
4.4 Conceptos sobre Mecánica molecular.	52
4.5 Fuerzas intermoleculares.	56
4.6 Conceptos sobre los programas utilizados	57
4.6.1 Programas para alineamiento de secuencias	57
4.6.2 Spdb-viewer	58
4.6.3 GRAMM (<i>Global Range Molecular Matching</i>) versión 1.03	59
5. MATERIALES Y METODOS	62
5.1 Obtención de coordenadas de las proteínas de PDB (Protein Data Bank)	62
5.2 Estudio de los residuos de interacción con los ligandos.	63
5.3 Alineamiento de secuencias.	64
5.4 Diseño del modelo de la región de interacción con agonistas para NR2B.	65
6. RESULTADOS Y DISCUSION	66

6.1 Comparación de los residuos de interacción con ligando en proteínas periplásmicas y subunidad S1S2 de GluR2.	66
6.2 Alineamiento de secuencias.	74
6.3 Diseño del modelo estructural	74
6.3.1 Modelo para la región amino terminal.	76
6.3.1.1 <i>Docking</i> con glutamato	76
6.3.1.2 <i>Docking</i> con NMDA	77
6.4. Modelo para la región entre las zonas transmembranales TM4 y TM5	78
Conclusiones	91
Sugerencias	93
Anexos	
Bibliografía	

LISTA DE FIGURAS

	Figuras	Pag.
Figura No. 1	Esquema de sinapsis nerviosa	26
Figura No. 2	Comparación de las conformaciones de agonistas	27
Figura No.3	L-glutamato, agonistas y antagonistas	26
Figura No.4	Modelo general de receptores	33
Figura No.5	Estructura de la subunidad S1S2 de GluR2	33
Figura No.6	Estabilización de la estructura cerrada	34
Figura No.7	Agonistas y sus sitios de interacción en S1S2 de GluR2	35
Figura No.8	Comparación Ser-142 en 1FTK y 1FTJ	34
Figura No.9	Estabilizaciones de cierre de los lóbulos	36
Figura No.10	Modelo esquemático de la apertura del canal en GluR2	37
Figura No.11	Esquema representativo del receptor NMDA	37
Figura No.12	Estructura de ligadora de lisina 2LAO	49
Figura No.13	Comparación periplásmicas ligada y libre	49
Figura No.14	Aminoácidos que interactúan con histidina	50
Figura No.15	Ciclo de transporte de histidina	50
Figura No.16	Sitio de interacción en la ligadora de glutamina	51
Figura No.17	Dominio de unión a aspartato en 1VLT	51
Figura No.18	Interacciones de alfa-carboxilos	69
Figura No.19	Interacciones de alfa-amio	70
Figura No.20	Interacciones hidrofóbicas	71
Figura No.21	Desplazamientos de lee-38	72
Figura No.22	Flexibilidad de ligandos	73
Figura No.23	Modelo 1 de interacción con glutamato	80
Figura No.24	Modelo 2 de interacción con glutamato	81
Figura No.25	Modelo 3 de interacción con glutamato	82
Figura No.26	Modelo 1 de interacción con NMDA	83

Figura No.27	Modelo 1 de interacción con NMDA	84
Figura No.28	Modelo 2 de interacción con NMDA	85
Figura No.29	Modelo 3 de interacción con NMDA	86
Figura No.30	Comparación del modelo de unión del glutamato y NMDA	87
Figura No.31	Modelos de interacción con glutamato zona II	88
Figura No.32	Modelos de interacción con NMDA zona II	89
Figura No.33	Representación esquemática de las regiones definidas	90

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pag.
Tabla No. 1	Subunidades y genes de los receptores de glutamato	28
Tabla No. 2	Propiedades de las proteínas periplásmicas bacterianas	43
Tabla No. 3	Códigos de proteínas estudiadas	63
Tabla No. 4	Residuos de aminoácidos que interactúan con ligandos	66
Tabla No. 5	Secuencias homólogas en NR2B	74

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1. Alineamiento de secuencias entre ligadora de glutamina (1ggg) y NR2B
- Anexo 2. Alineamiento de secuencias entre ligadora de lisina (2Lao) y NR2B
- Anexo 3. Alineamiento de las secuencias de NR2B de tres especies diferentes
- Anexo 4. Alineamiento de las secuencias de las subunidades NR2

RESUMEN

Los receptores ionotrópicos de glutamato conforman canales iónicos dependientes de ligando que permiten el flujo de potasio (K^+), sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}), ampliamente distribuidos en el Sistema Nervioso Central (SNC). Están relacionados con todos los procesos de transmisión sináptica rápida, potenciación, depresión a largo plazo, plasticidad, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, también Epilepsia y procesos de aprendizaje y memoria, entre otros.

Se han clasificado farmacológicamente según los agonistas, que además del glutamato, interactúan con el receptor, en tres grupos: AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasole propionato), KA (kainato) y NMDA (N-metil-D-aspartato). Los dos primeros permiten el flujo de potasio, sodio y se ha encontrado que sus regiones extracelulares presentan homología con las proteínas periplásmicas bacterianas ligadoras de aminoácidos, LAOBP (Ligadora de lisina, arginina, ornitina), HBP (Ligadora de histidina), GBP (Ligadora de glutamina), las cuales han sido utilizadas como modelos para la comprensión del mecanismo de interacción ligando – receptor.

Diferentes autores han trabajado a partir de un constructo quimérico del receptor de glutamato GluR2 denominado dominio S1S2 que representa la región extracelular involucrada en la unión del glutamato, agonistas y antagonistas. Ha sido cristalizado en forma libre y con los ligandos, glutamato, AMPA, Ka y DNQX, denominados con los códigos PDB, 1FTJ, 1FTM, 1FTK, 1FTL, respectivamente. Esto ha permitido realizar diferentes modelos sobre la estructura y el funcionamiento del canal.

Para los receptores sensibles a NMDA se ha dificultado más su estudio, ya que su estructura y tamaño son mucho más complejos. Permiten el paso de iones calcio y presenta tres tipos de subunidades diferentes, NR1, NR2, NR3, cada una de ellas con diversas

variantes terminando en una organización multimérica compleja y con diferente estequiometría de acuerdo con las zonas del cerebro donde se encuentren.

En este trabajo se realiza un modelo de la región extracelular de la subunidad NR2B que permite la unión del glutamato, y un mecanismo de su interacción con glutamato y NMDA; utilizando herramientas computacionales como programas de alineamiento de secuencias (LALING, ClustalW), programas de análisis estructural (Spdviewer 3,7b) y el programa Gramm versión 3.01 para el reconocimiento estructural o *docking* de las estructuras contra glutamato, NMDA.

Se propone la unión del glutamato en la región amino terminal que comprende los primeros 558 residuos mediante interacciones electrostáticas facilitadas por R-519, N-515 y S-520. NMDA se une en el mismo sitio de manera similar.

ABSTRACT

The ionotropic glutamate receptors conform ligand dependent ionic channels, that allow the Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ions flux, they are mainly distributing in Central Nervous System (CNS). They are related with all the fast synaptic transmission, long term potentiation, long term depression, plasticity process, pathological changes like Alzheimer, Parkinson, Huntington, Epilepsy, memory and learning process.

They have been pharmacologically classified according to agonist that, likewise glutamate, interact with the receptor; in three groups: AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate), KA (kainate) y NMDA (N-methyl-D-aspartate). The two first allow the influx of potassium, sodium and it have been find that their extra-cellular regions show homology with some bacterial periplasmic aminoacid binding proteins, LAOBP (Lysine, arginine, ornithine binding protein), HBP (Histidine binding protein), GBP (Glutamine binding protein), which have been used like models for interaction mechanism understanding.

Different authors have worked with a glutamate receptor chimeric construct, named S1S2 GluR2, that represents the extra-cellular region involved in the glutamate, agonist and antagonist binding. It have resolved the crystal structure in free form end with ligands, glutamate, AMPA, KA, DNQX with PDB code, 1FTJ, 1FTM, 1FTK, 1FTL, respectively This have allowed make different channel structure and function models.

For NMDA receptors, it has been difficult their understanding because their structure and size are more complex. They allow the influx of calcium and have three different subunit classes, NR1, NR2, NR3, each one with several variants, multimeric complex organization and a stequiometry according to brain zone where it find.

In this work it made an extra-cellular model of the NR2B subunit, that allows the glutamate binding, and their interaction mechanism with glutamate and NMDA using computational tools like aling sequence programs (LALING, ClustaW), structural analysis programs (Spdviewer 3,7b) and Gramm version 3.01 for the docking against glutamate, NMDA.

It propose the glutamate binding in amino-termini region that correspond to the first 558 aminoacids, throught electrostatic interactions make easy by R-519, N-515 and S-520. Binding NMDA is the same that it.

1. INTRODUCCION

Un simple “pinchazo”, una sensación de calor, frío, dolor, un pensamiento, una imagen o sonido memorizado, la pérdida de memoria y cualquier tipo de enfermedad relacionada con el funcionamiento de nuestro sistema nervioso central (SNC) están determinados por funciones celulares específicas, una de ellas, de gran importancia, es la comunicación entre células nerviosas o neuronas, la cual permite la transmisión de señales desde el sistema nervioso periférico (SNP) hasta el SNC y la generación de una respuesta o reacción. Estas señales están determinadas, en gran medida, por sistemas proteicos ligando – receptor.

Uno de estos sistemas de proteínas son los receptores de glutamato, los cuales se encuentran involucrados en transmisión sináptica rápida, potenciación y depresión a largo plazo, plasticidad, funciones cognitivas, enfermedades neurodegenerativas como: Alzheimer, Parkinson, Esquizofrenia, Epilepsia, entre otras.

Estudios realizados hasta el momento indican que es un sistema de alta complejidad. Incluye dos familias de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos. Los primeros clasificados farmacológicamente por especificidad de unión a diferentes agonistas: AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasole propionato), KA (kainato) y NMDA (N-metil-D-aspartato). Permiten el flujo de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} dependiente de ligando. Los metabotrópicos (mGluR) desarrollan respuestas a partir de señalizaciones mediante proteína G, fosfoinositol y AMP cíclico.

Para la región exoplasmática se ha encontrado una relativa similaridad de secuencia con las proteínas periplásmicas bacterianas. Estas proteínas mucho más pequeñas y ubicadas en la región, como su nombre lo indica, periplásmica de bacterias *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia Coli* han sido cristalizadas y resuelta su estructura, por difracción de rayos X, en las formas no ligada o forma apo y ligada. Han sido utilizadas para formular el modelo de acción de la región extracelular encargada de interactuar con glutamato en los receptores

ionotrópicos iGluR2, AMPA y KA. Adicionalmente, para estos receptores, Kusinnen et al. realizaron la extracción de una región exoplasmática entre el amino terminal y la primera hélice transmembranal M1, y, una vuelta entre las zonas M3 y M4 conectados por una secuencia corta sintética que llamaron *linker*, generando un cosntructo quimérico hidrosoluble, del cual fue resuelta su estructura por difracción de rayos X, en la forma apo y ligada a los agonistas AMPA, KA, glutamato y el antagonista DNQX (Acido quinoxalinedionico).

En este trabajo se estudian como modelos las proteínas bacterianas de unión de aminoácidos como LAOBP, HBP, LIVBP, QBP, la transportadora de aspartato en *Salmonella Typhimurium* y el constructo quimérico de los receptores AMPA y KA.

Aunque no se encuentra gran similitud entre las secuencias de las proteínas periplásmicas y los receptores de glutamato, iGluRs, los sustratos que enlazan son parecidos en sus grupos funcionales y pueden tener tipos de interacciones parecidas con residuos de aminoácidos, en el sitio de unión, comunes. Esto permite diseñar y proponer un modelo de la interacción entre la región exoplasmática de la subunidad, que controla la unión del glutamato, NR2B, y los agonistas, glutamato y NMDA, perteneciente al receptor ionotrópico sensible a N-metil-D-aspartato. Utilizando las estructuras obtenidas de la base de datos PDB (Protein Data Bank) y las herramientas suministradas por los programas Spdviewer versión 3,7b, Gramm versión 3.01, y los programas de alineamiento de secuencias LALING y ClustalW se puede realizar el diseño de un mecanismo de interacción y de un modelo de la región exoplasmática para el receptor sensible a NMDA.

Conociendo el mecanismo de interacción y la región interactuante se pueden planear posteriormente trabajos experimentales encaminados a la sustitución por mutagénesis dirigida de los residuos interactuantes y verificar su función en la afinidad del ligando. Lo que, a su vez, finalmente permitirá entender la influencia de la unión del ligando en la apertura del canal y su permanencia.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar el modelo del mecanismo y la estructura del sitio de interacción de la subunidad NR2B del receptor ionotrópico de glutamato sensible a N-Metil-D-aspartato (NMDA) con glutamato y NMDA, a partir de la homología con las proteínas periplásmicas bacterianas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar los residuos de amino ácidos presentes en los sitios de interacción de la subunidad S1S2 del receptor de glutamato iGluR2 y las proteínas periplásmicas bacterianas.
- Encontrar regiones de homología entre las secuencias de la subunidad NR2B y las periplásmicas a partir de alineamientos de secuencia.
- Diseñar, por mutaciones puntuales con el programa spdvviewer, la región de interacción con glutamato, a partir de las zonas homólogas con las periplásmicas.
- Analizar el mecanismo de interacción del glutamato y NMDA con la región diseñada, a partir del “docking” de las estructuras con el programa Gramm.
- Generar un modelo predictivo para las interacciones con glutamato y NMDA.

3. ANTECEDENTES

En 1990 McDonald et al., y en 1993 Bliss et al. , identificaron el papel que juega el glutamato como neurotransmisor del sistema nervioso central, en neurodesarrollo, plasticidad sináptica y desordenes neurodegenerativos. (Cotman, C., et al. , 1995)

Esto generó el comienzo de un estudio que continúa desarrollándose alrededor de las proteínas receptores de glutamato y agonistas, estos últimos han determinado la clasificación de estos receptores en los tres grupos antes mencionados, kainato, AMPA y NMDA.

Los estudios comenzaron con la determinación estructural y funcional de estos receptores. Kusinnen et al., en 1995, realizaron, mediante experimentos de mutagénesis de sitio dirigido, el diseño de constructos quiméricos de la región que interactúa con el agonista al cual denominaron S1S2. (Dingledine, et al., 1999). En 1998 se identificó la estructura del centro de interacción del receptor en complejo con kainato, y en 2000 con AMPA, glutamato y el antagonista DNQX. (Armstrong N. Gouaux E., 1998, 2000)

Encontraron que la estructura se organizaba en dos dominios lobulares que llamaron α y β (S1 y S2) con el amino terminal localizado en el dominio 1 y el carboxi – terminal en el dominio 2. S1 incluye 150 residuos de aminoácidos del amino terminal previo al primer segmento transmembranal y S2 comprende los residuos entre los segmentos asociados a membrana M3 y M4. El agonista se encuentra entre los lóbulos participando de múltiples contactos polares con los residuos de ambos dominios, entre una especie de hendidura que se cierra en la interacción del liando con algunos residuos de aminoácidos importantes como R- 485, T-480, E-705, Y-450, P-478, T-655 identificados a partir de mutaciones y evaluación de la actividad. Aunque el AMPA y glutamato indujeron un mayor cierre de los lóbulos, a diferencia del DNQX que no presenta mayor movimiento con respecto a la forma

apo, la cual puede ser la razón por la que actúe como antagonista. (Armstrong N. Gouaux E., 1998, 2000)

En 1998 se desarrolla un modelo de este tipo de receptores para las regiones transmembranales con el N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular, los segmentos M1, M3 y M4 atravesando la membrana y el M2 insertado medianamente en el interior del poro del canal, incluyendo el modelo de la región S1S2. (Lampinen et al., 1998)

Para todas estas estructuras los lóbulos S1 y S2 actúan como brazos que encierran el ligando asociado con cambios conformacionales notables los cuales son el interés de nuestro estudio.

Del receptor sensible a NMDA se sabe que tiene una serie de propiedades importantes que lo distinguen de los otros. Los iones de Mg^{++} bloquean el canal y le restan potencial, y la corriente solo fluye cuando se libera en la sinapsis, el agonista. Muestra una alta permeabilidad al calcio (Ca^{++}) cuyo flujo puede activar importantes procesos celulares. Para mayor eficiencia en su función deben estar ligados glutamato y glicina con sitios de unión para cada uno. (Lesley et al., 1998)

Estos receptores son hetero-oligómeros compuestos de tres tipos de subunidades hasta ahora identificadas: La subunidad NR1 que presenta por *splicing* diferentes variantes, uno o más tipos de NR2 (A, B, C, D) y NR3 de la cual no se conoce mucho.

Su estructura, desconocida aun, se basa en los modelos de las estructuras de receptores de función similar y el sitio de unión a partir de las proteínas ligadoras de amino ácidos. Se cuenta con modelos similares a los propuestos para AMPA. Un dominio amino terminal extracelular, tres segmentos transmembranales y una vuelta que entra parcialmente en la membrana y parece contribuir con el poro de canal. (Hirokasu, H., et al., 1996)

Se han hecho varios estudios de los sitios de unión a glutamato y a glicina. En 1996 Hirokasu et al. identifican este sitio para glicina en la subunidad NR1, específicamente en

la vuelta entre los segmentos transmembranales M3 y M4 y en 1998 Ivanovic et al. lograron expresar y caracterizar el dominio de unión a glicina mediante un constructo soluble que contenía el denominado S1S2 de la subunidad NR1 totalmente activo determinando que las afinidades de unión de glicina eran significativamente diferentes en diversas mezclas heteroméricas del receptor lo que permite pensar que la subunidad NR2 aunque no tiene sitio de unión, directamente a glicina, podría contribuir en la conformación del sitio de interacción en NR1.

Igualmente en 1998 Lesley et al. identificaron residuos de amino ácidos en la subunidad NR2A que contribuyen a la unión de glutamato sugiriendo que esta subunidad es la moduladora de la interacción del glutamato, así como NR1 es modulador de la interacción de glicina.

Por otro lado se encuentra un grupo de proteínas de periplásmas bacterianos, las permeasas, ligadoras de aminoácidos que por la similitud química entre los aminoácidos que unen y los agonistas de nuestro estudio son un blanco para utilizar como modelo de estudio.

En 1989 Sack et al. publicaron la estructura refinada de la ligadora de leucina (LBP – *Leucine binding protein*) y la de Leucina, Isoleucina, Valina (LIVBP – *Leu, Ile, Val binding protein*). En 1993 Byung et al. obtuvieron la estructura de Lisina, Arginina Ornitina (LAOBP – *Lys, Arg, Orn binding protein*), y en 1995 la estructura de la ligadora de Histidina (HisJ).

En la comparación y los alineamientos de secuencia de estas proteínas con el dominio S1S2 se ha encontrado alguna similaridad, fundamentalmente en la hendidura que se forma para la interacción con el ligando entre las subunidades S1 y S2, lo que permite realizar modelos estructurales basados en la homología como en el trabajo realizado por Lampinen et al. en 1998, en donde se basa en las interacciones específicas que se presentan en las ligadoras de aminoácidos encontrando que las interacciones ligando – receptor están

mediadas por la presencia de residuos cargados como Arg507, Glu727, Arg 77, y Asp161 que por homología se encuentran en iGluR.

Teniendo en cuenta estas premisas se utilizarán las proteínas ligadoras de aminoácidos y la estructura de unión de kainato y AMPA cuyas estructuras tridimensionales se encuentran en PDB para identificar patrones de interacción receptor – ligando que permitan generar un modelo predictivo para la interacción de NMDA.

4. MARCO TEORICO

4.1 Glutamato como neurotransmisor:

El L-Glutamato, es uno de los principales aminoácidos neurotransmisores excitatorios involucrados en la señalización interneuronal en el cerebro y en la espina cordal del SNC.

El sistema funciona a partir del almacenaje de L-Glutamato en pequeñas vesículas localizadas en el citoplasma de las terminales axónicas de la célula presináptica como se observa en la figura 1. Este almacenaje depende de proteínas específicas, transportadores vesiculares, que determinan qué glutamato es usado como neurotransmisor en una neurona. Los niveles citoplasmáticos de glutamato son cercanos a 10mmol/l y la concentración dentro de las vesículas puede llegar a ser mayor de 60mmol/l; esto quiere decir que una gran cantidad de glutamato puede ser liberada en el espacio sináptico. Las vesículas son transportadas hacia la terminal axónica, acumulándose en una zona activa o zona especializada que permitirá la fusión de las vesículas a la membrana plasmática. Adicionalmente, esta zona activa contiene numerosos canales de calcio dependientes de voltaje, es decir, permiten el flujo de iones calcio en respuesta a una excitación eléctrica; el calcio entra en la célula presináptica, se liga a proteínas de las vesículas y produce la exocitosis. (Mennerick S, Zorumski Ch., 2001)

Las moléculas de glutamato, una vez liberadas, se ligan a proteínas receptoras específicas, integrales de la membrana plasmática, en la neurona postsináptica; induciendo un cambio en el flujo de iones a través de esta membrana.

Existen dos tipos principales de receptores de glutamato. Los primeros son los canales iónicos o receptores ionotrópicos, proteínas transmembranales que contienen un sitio de unión para el glutamato y una región que actúa como canal, el cual se abre en respuesta a la unión del glutamato permitiendo el flujo de iones y un cambio de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática. Los segundos, los receptores metabotrópicos, están

relacionados con proteína G, tienen un sitio de unión de glutamato y alteran el flujo de iones, pero de manera indirecta, es decir, disparando cascadas de señalización intracelular que resultan en la fosforilación de proteínas, alterando nuevamente el flujo de iones.

4.2 Receptores Ionotrópicos de Glutamato:

Estos receptores se clasifican también a partir de sus propiedades farmacológicas y funcionales. Teniendo en cuenta su afinidad a ciertas moléculas sintéticas que actúan como agonistas, es decir, generan la misma función que el glutamato y antagonistas que bloquean la acción del receptor, se han clasificado en tres grupos: Receptores ionotrópicos activados por NMDA (N-metil-D-Aspartato), responsables de ciertas formas de plasticidad sináptica como potenciación a largo plazo ("*Long term potentiation*" - LTP), depresión a largo plazo ("*Long term depresión*" - LTD), permitiendo el flujo de Ca^{2+} . Los receptores no NMDA responsables de transmisión excitatoria corta y rápida, activados por AMPA (Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propiónico) y por KA (Kainato), permiten el flujo de iones sodio (Na^+), potasio (K^+) en sistema antiporte, y en menor proporción el calcio (Ca^{2+}). A continuación haré una descripción breve de los diferentes ligandos para comprender mejor los modelos estructurales de los receptores. (Mennerick S, Zorumski Ch., 2001)

4.2.1. Consideraciones generales sobre las estructuras de los ligandos:

Como son receptores dependientes de ligando, ha sido de gran importancia la síntesis de diferentes moléculas agonistas y antagonistas de interés académico y clínico, como blanco para el diseño de drogas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Como se observa en la figura 2, la estructura de estos análogos se basa en la presencia de un grupo amino básico y dos grupos ácidos. El amino y uno de los ácidos, preferiblemente en posición alfa y el otro ácido en omega, con una distancia relativamente constante entre los dos (3,82Å para NMDA, 4,36Å para glutamato, 4,49Å para KA, 4,85Å para AMPA) y cierta flexibilidad conformacional, es decir, rotación de enlaces en los ácidos y

movimientos de visagra alrededor del plano formado entre los grupos carboxilo. Los receptores NMDA toleran análogos en configuración D y cadenas de longitud más corta que los de AMPA y KA, el grupo amino sustituido encaja solo si el sustituyente es pequeño y compacto, los sustituyentes muy voluminosos en esta posición no interactúan con NMDA (Watkins, et al., 1990)

Los carboxilos sirven como donadores de protones y formadores de puentes de hidrógeno con grupos amino de residuos como arginina y lisina. El grupo amino puede ser aceptor de protones y facilitar también algún puente de hidrógeno. Estas características se buscan para diseñar agonistas como se aprecia en los sitios de unión de las estructuras de NMDA, AMPA y KA, pero para antagonistas se busca que presenten grupos donadores en posiciones diferentes a alfa y omega más distantes o más cercanos como ocurre con DNQX, que es antagonista de AMPA, o presentar solo grupos amino como el caso de MK-801, antagonista de NMDA.

Una diferencia estructural entre los agonistas selectivos de NMDA y los no-NMDA es la longitud de cadena entre los carboxilos. Los sitios de reconocimiento de grupos ácidos están más distantes en receptores AMPA que en NMDA (Watkins, et al., 1990). Los antagonistas, aunque interactúan en el mismo sitio del agonista, por su tamaño impiden el cambio conformacional del receptor responsable de la actividad del agonista. (Dingledine, R. et al., 1999).

Se ha visto en la comparación de las estructuras, mediante el programa Spdbviewer, libres e interactuando en el sitio de unión, que los agonistas se caracterizan por presentar mayor flexibilidad, ya que, debido a la interacción, se presentan desplazamientos de los grupos carboxilo, acercándose uno a otro, rotaciones de enlaces carbono hidroxilo y movimientos importantes de los grupos metileno en función de interacciones hidrofóbicas, en la figura 3 se observa la diferencia en las distancias entre grupos funcionales de algunos agonistas. Para los antagonistas podría pensarse que su interacción diferente se debe a la flexibilidad limitada por la presencia de sustituyentes voluminosos como los anillos en DNQX

4.2.2 Conformación de los receptores y modelos estructurales:

4.2.2.1 Receptores No- NMDA:

Cada una de las subunidades de estos receptores son codificadas por al menos seis familias de genes, una para AMPA, dos para Kainato y tres para NMDA, con alguna similaridad en las secuencias, lo que sugiere un origen común de evolución. (Dingledine, R. et al., 1999). En la tabla 1 se muestran los receptores con cada una de las subunidades y el nombre de los genes que las codifican.

Tabla No. 1. subunidades y genes de los receptores de glutamato

Familia de Receptores	Subunidades	Genes
AMPA	GluR1	GRIA1
AMPA	GluR2	GRIA2
AMPA	GluR3	GRIA3
AMPA	GluR4	GRIA4
Kainato	GluR5	GRIK1
Kainato	GluR6	GRIK2
Kainato	GluR7	GRIK3
Kainato	KA-1	GRIK4
Kainato	KA-2	GRIK5
NMDA	NR1	GRIN1
NMDA	NR2A	GRIN2A
NMDA	NR2B	GRIN2B
NMDA	NR2C	GRIN2C
NMDA	NR2D	GRIN2D
NMDA	NR3A	GRIN3A
NMDA	NR3B	GRIN3B

Estos receptores son activados, además del agonista, por moduladores que en conjunto permiten la apertura del canal. La permeabilidad a calcio, aunque es menor en AMPA y Kainato que en NMDA, está determinada por la subunidad presente en el ensamblaje.

Estas proteínas transmembranales son construidas como pentámeros o tetrámeros a partir de diversas subunidades de proteína. Diferentes autores han realizado análisis de mezclas funcionales de subunidades nativas y mutantes con variable sensibilidad a bloqueadores y por análisis de velocidad de sedimentación, entre otras, se han definido estructuras pentaméricas, tetraméricas e incluso triméricas, como se representa en el esquema de la figura No.4 (Dingledine, R. et al., 1999)

Esto significa que existen múltiples subtipos de estos receptores con diferente composición de subunidades y además, pueden coexistir en una misma neurona. Se ha encontrado que receptores tipo AMPA con alta y baja permeabilidad al calcio se encuentran simultáneamente en neuronas de ganglio retinal. (Dingledine, R. et al., 1999)

Estos receptores no presentan una estequiometría fija como los de Acetil colina del músculo. Para los receptores sensibles a NMDA, por experimentos de microscopía electrónica realizados por Lareo y colaboradores se han encontrado agrupaciones de tres, cuatro y cinco subunidades lo que confirma la multifuncionalidad del receptor.

El modelo propuesto para cada subunidad se encuentra en la figura 4 y se basa en la formación de tres dominios transmembranales M1, M3, M4, una vuelta re-entrante entre las regiones transmembranales uno y tres, M2, que se cree está involucrada en la formación del poro; un amino terminal localizado en la parte extracelular y un carboxi terminal en la parte intracelular. (Amstrong. N. et al., 1998).

Para los receptores no-NMDA, se ha encontrado una región extracelular entre la zona amino – terminal y la primera hélice transmembranal denominada S1 que incluye aproximadamente 150 residuos desde la región amino – terminal hasta el primer segmento

transmembranal y S2 que comprende una vuelta grande entre las hélices transmembranales M3 y M4. Estas dos regiones forman el sitio de unión del glutamato y los correspondientes agonistas. Ha sido estudiado a partir del diseño de un constructo quimérico del receptor GluR4 y GluR2, en el cuál S1 y S2 fueron acopladas por un segmento sintético de 13 residuos con propiedades similares a las del receptor ensamblado en membrana, pero hidrosoluble y relativamente fácil de cristalizar, al cual llamaron dominio S1S2 iGluR. A partir de este se han determinado estructuras de la forma apo o libre sin ligando y ligada con agonistas como KA, AMPA, glutamato y el antagonista DNQX (Acido quinoxalinedionico), con códigos PDB, 1FW0, 1FTM, 1FTJ, 1FTL respectivamente. (Armstrong. N et al., 1998).

Su estructura se encuentra en un arreglo de dominios α/β en forma de un riñón. Con longitud de 59,15 Å y un ancho de 29,9 Å. Su forma bilobular con un lóbulo más grande que otro unidos por dos hojas β permite un movimiento de bisagra, una vez se ha enlazado el ligando como se aprecia en la figura 5.

En 1998 se sugirió que la unión de diferentes agonistas puede resultar en grados variables de cierre del dominio y efectivamente se confirmó que para AMPA y Glutamato es más evidente el cierre de los lóbulos, con respecto a Kainato. (Armstrong. N., et al.,1998;2000)

Comparando las formas abierta y cerrada, con los diferentes ligandos, se encontraron los valores de RMS que permiten observar qué tanto se desplaza la estructura con respecto a la forma abierta.

La superposición de la estructura ligada con DNQX, AMPA, Glutamato y apo. Permite ver que el desplazamiento de los lóbulos es más pronunciado para Glutamato, un poco menos para AMPA, y mucho menos para los otros.

Se comprende mejor si se observan los valores de RMS para glutamato 2.34 Å, AMPA 2.47 Å, kai 1.87 Å y DNQX 0.9 Å. El menor valor corresponde a DNQX con menor

capacidad para inducir movimiento, debido a que estabiliza la conformación abierta por interacciones antagonista – receptor. Forma un puente de hidrógeno entre T-174 del lóbulo II y el oxígeno del grupo nitro del anillo de DNQX, que en conformaciones cerradas con agonistas se presenta formando interacción con E-13 del lóbulo I estabilizando la forma cerrada, como se indica en la figura 6. (Amstrong, N. Gouaoux E. et al., 2000)

Los grupos carboxilo de estas moléculas actúan como aceptores de protones y los grupos amino como donadores. Estas características hacen que se presenten interacciones específicas con grupos como el guanidinio de la Arginina, hidroxilo de treonina, serina y estabilizaciones hidrofóbicas facilitadas por anillos aromáticos. En la figura 7 aparecen los residuos de aminoácidos que interactúan directamente con el kainato, AMPA, glutamato y DNQX.

El potencial electrostático de estos ligandos es altamente negativo y su carga neta es -1 . Estos efectos parecen ser compensados por la formación de puentes de hidrógeno específicos. (Amstrong, N., Gouaoux E. 2000).

Aunque los residuos de interacción son comunes en agonistas y antagonistas se presentan algunas variaciones que podrían explicar la diferencia en las afinidades de estos sustratos. A continuación se hace una comparación de dichas variaciones.

El kainato aunque es agonista no induce mayor desplazamiento de los lóbulos; el grupo isoprenilo del kainato está parcialmente expuesto al solvente y se proyecta por debajo de la Y-61. La explicación de que la unión del kainato sea relativamente débil en GluR2 es la escasez de interacciones con este grupo isoprenilo. (Amstrong, N., et al.,1998) El amino del anillo hace puente de hidrógeno con el carboxilato de E-193 y el oxígeno carbonilo de P-89. E-13 en el lóbulo II y T-174 del lóbulo I aportan a la estabilización del cierre de los lóbulos por formación de puente de hidrógeno entre sí, como ya se observaba en la figura 6. La Y-61 que en la estructura con glutamato presenta interacción con E-13, en esta

parece tener una significativa interacción hidrofóbica con el grupo metileno de kainato; por tanto E-13 sólo forma puente de hidrógeno con T-174.

El hidroxilo de S-142, contrario a lo que ocurre con glutamato, en el kainato hace una rotación para generar un puente de hidrógeno con R-96 en lugar de formar uno con E-193 observe la comparación en la figura 8.

En la estructura ligada con AMPA se observa un comportamiento similar al de glutamato, induce de igual manera el cierre de los lóbulos. Tanto con AMPA como con glutamato y kainato la interacción entre R-172, S-140 del lóbulo I, y, K-60, G-62 del lóbulo II favorece mucho más el cierre de los lóbulos presentando un gran desplazamiento para formar puentes de hidrógeno entre sí, por el contrario, con DNQX no se presenta ninguna interacción, lo que explica el cierre poco significativo, en la figura 9 se observa el efecto.

La R-96 es conservada en todos los receptores de glutamato y cuando es mutada por lisina, en GluR2 y GluR4, la unión de AMPA queda eliminada, incluso la mutación equivalente en la subunidad NR2B del receptor sensible a NMDA elimina el flujo de corriente en complejos del receptor. (Amstrong, N., Gouaux E. 2000).

De acuerdo con esto han llamado al glutamato y a AMPA agonistas totales por que permiten una mayor activación del canal, en receptores sensibles a AMPA, si se piensa que la nueva configuración cerrada de la subunidad permite, de alguna manera, la apertura del canal. (Amstrong, N., Gouaux E. 2000)

A partir de estos análisis Amstrong desarrolló un modelo que aparece en la figura 10, donde explica el mecanismo de unión del ligando acoplado a la apertura del canal. En el estado apo los dominios se encuentran abiertos, una vez interactúa el glutamato mediante sus grupos α -amino y α -carbonilo con R-96, P-89, T-91, E-193, se induce el cierre generando un reacomodamiento de las subunidades, lo cual promueve la activación del canal.

Asumiendo que estos receptores son tetraméricos, que el dominio de unión al ligando S1S2 es dimérico y que el portal del poro se encuentra en la superficie extracelular, la unión del agonista induce un movimiento del dominio II, de tornillo hacia la derecha permitiendo la apertura del canal. (Armstrong, N. Gouaux E. 2000).

Estas son las características fundamentales de los receptores no-NMDA para los que se han realizado mayor número de estudios y aunque su estructura completa no se conoce, existen modelos que se han querido aplicar a los receptores NMDA; sin embargo algunos autores prefieren postular otras hipótesis frente a estos receptores mucho más complejos y de mayor tamaño.

La siguiente es una descripción general de lo que se conoce a cerca de los receptores sensibles a NMDA.

4.2.2.2 Receptores NMDA:

El receptor de glutamato sensible a NMDA consiste de tres tipos de subunidades, hasta ahora identificadas. La subunidad NR1 producida por el gen que lleva su nombre, el cual produce por *splicing* ocho isoformas diferentes y funcionales con modificaciones en tres sitios específicos: N1 (inserción de exón 5 en N – terminal), C1 (delección de exón 21 en C – terminal), C2' y C2 el uso de un sitio aceptor de *splicing* alternativo. En el exón 22 del C – terminal. En células mamíferas esta subunidad necesita estar expresada con la NR2 para dar receptores funcionales, aunque en oocitos de *Xenopus* se encuentran receptores homoméricos de NR1 funcionales. (Cull-Candy S., Brickley S., 2001)

La NR2 está conformada por cuatro tipos: A, B, C, y D con genes diferentes. Es funcional solo en composiciones heteroméricas y las propiedades del receptor están fuertemente influenciadas por el tipo de subunidad NR2 presente. Esta subunidad es moduladora de la unión del glutamato fundamentalmente NR2B.

Las NR3 se origina de dos familias génicas A y B, son funcionales solo cuando están coexpresadas con la NR1 y NR2, aun no es clara su función específica.

Esto sugiere que el receptor funcional ha de ser un gran complejo pentamérico o tetramérico que contiene por lo menos una NR1 y otras de NR2 o NR3. Se desconocen los patrones de ensamblaje, el número y tipo de isoformas de NR1 y NR2 es elevado, incluso pueden tener propiedades fisiológicas y farmacológicas distintas, una neurona puede expresar un amplio rango de complejos con diferente funcionalidad.

Además de unir glutamato, requiere de un coagonista, la glicina, para su activación y otras moléculas presentes en el medio extracelular como los iones Mg^{++} que se unen a un sitio localizado en lo profundo del canal, dependiendo del potencial de membrana y bloqueando el flujo de iones Ca^{++} . Este bloqueo se elimina por despolarización en el momento que interactúa el glutamato y se activa el canal. (Dingledine, et al., 1999)

Adicionalmente, cationes divalentes como Zn^{++} , inhiben el receptor de manera dependiente de voltaje, observándose una reducción en la frecuencia de apertura y la disminución en el tiempo de duración de la apertura del canal, e independiente de voltaje a bajas y altas concentraciones generando frecuencias por debajo de las observadas. Este bloqueo parece ser mucho mayor que el causado por Mg^{++} debido a que la permeación del Zn^{++} también es mayor e involucra los mismos residuos de aminoácidos en el poro. También parece ser dependiente de la composición de subunidades básicamente la presencia de NR2; se ha encontrado que receptores formados por NR2A son muy sensibles al Zn^{++} en el orden nanomolar, 60 a 80% más que otras composiciones. (Dingledine, et al., 1999)

La inhibición también está dada por la concentración de protones en el medio extracelular, se presenta en una reducción en la frecuencia de apertura del canal independiente del voltaje y del agonista más que en un cambio en la conductancia.

La interacción de poliaminas endógenas y toxinas han sido de gran interés de estudio por sus funciones terapéuticas e implicaciones neurofisiológicas. Las poliaminas toxinas

pueden causar inhibición dependiente de voltaje, potenciación dependiente de glicina, potenciación independiente de glicina y voltaje en receptores nativos y recombinantes. A bajas concentraciones de glicina, las poliaminas pueden estimular el receptor más que a altas concentraciones. Ambas potenciaciones están influenciadas por la presencia de la subunidad NR2, aunque la potenciación glicina dependiente ocurre en receptores con NR2A y NR2B, la glicina independiente se observa con NR2B incorporada. La figura 11 representa un esquema de los sitios de unión de moduladores y agonistas. (Dingledine, et al., 1999)

Al igual que los otros receptores, se ha postulado el modelo de cuatro dominios transmembranales M1, M2, M3 y M4; M2 es reentrante y hace parte de poro y el bloqueo por Mg^{2+} . Se ha encontrado que mutaciones de residuos de asparagina por glutamina en esta región de la subunidad NR1 y NR2 influyen en la permeabilidad a Ca^{++} y el bloqueo por Mg^{++} . Encontrando que la N-614 en NR2B está involucrada notablemente en el bloqueo por magnesio. Se ha postulado que el calcio, a medida que ingresa por el poro, actúa como bloqueador por tanto tendrá un sitio de unión también en el canal diferente al de magnesio ya que el bloqueo por calcio no es dependiente de voltaje solo de la concentración de calcio extracelular. (Sharma, G., Stevens, Ch., 1996b, Jahr, C., Stevens, Ch., 1993)

El influjo de Ca^{2+} a través del canal genera una sinapsis a largo plazo, a diferencia de AMPA y KA que generan sinapsis de corto plazo. Además, controla la plasticidad sináptica en cerebro y generan puntos de vulnerabilidad patológica. Excesos de calcio intracelular pueden ser tóxicos en neuronas y una sobre estimulación puede resultar en exitotoxicidad y muerte celular que contribuye a condiciones severas de patologías como epilepsia, isquemia, Alzheimer, entre otras.

Como ya se mencionó anteriormente la distribución de las subunidades es variable, incluso, a través del mismo tejido. Los patrones de expresión del mRNA son consistentes con receptores heteroméricos con una unidad común NR1 y varias NR2, y NR3. NR1 es

expresada a altos niveles en muchas neuronas, mientras que NR2 muestra distintas ubicaciones espacio-temporales durante el desarrollo hasta el cerebro adulto.

La topología de las subunidades se basa en modelo similar para AMPA y KA, aunque algunos autores, como Hollman creen en la presencia de cinco regiones transmembranales que conservan el amino terminal en la parte extracelular y el carboxi terminal intracelular, así como la región del poro formada por la región M2, que no se comporta como vuelta. Modelo que podría permitir mayores explicaciones de su función. (Seeburg, P.H. 1993.)

Así como para el estudio de la estructura de los receptores AMPA y KA se realizó un constructo quimérico para explicar la interacción del agonista con la región extracelular; para NMDA se ha utilizado como modelo el canal de potasio de *Streptomyces lividans* y mediante alineamientos de estructura y mutaciones se ha definido el mecanismo de interacción del antagonista MK-801. (Bachurin et. al. 2001).

Este receptor también tiene relativa homología de secuencia con las proteínas periplásmicas que han servido como modelo para el estudio de los no- NMDA, razón por la cual, estas pueden ser blanco para el diseño de un posible modelo de interacción del receptor con glutamato y agonistas. En el siguiente apartado haré una descripción de la estructura de estas proteínas.

4.3 Proteínas periplásmicas bacterianas:

La envoltura celular de las bacterias Gram-negativas es una estructura compleja formada por una membrana externa, una delgada pared celular, un espacio periplásmico y la membrana citoplasmática. Esta envoltura facilita la comunicación célula a célula y el transporte de nutrientes para lo cual se encuentra el sistema de permeasas o transporte periplásmico.

El sistema de transporte periplásmico bacterial transporta una amplia variedad de sustratos, tales como: aminoácidos, péptidos, monosacáridos, oligosacáridos, iones inorgánicos y

vitaminas. Consiste en una proteína de unión al sustrato ubicada en la región periplásmica que actúa como un receptor inicial y un complejo transmembranal que transloca el sustrato desde el espacio periplásmico hasta el citoplasma.

Los sustratos se enlazan primero a las proteínas ligadoras con mayor afinidad que al componente ensamblado en membrana. Luego de unir el sustrato correspondiente, estas proteínas interactúan con el complejo integral de membrana y se da la translocación acompañada de la hidrólisis de ATP o GTP por proteínas asociadas a membrana. (Byung-Ha, Jayvardhan Padit, 1993.)

Se han determinado las estructuras cristalinas para ocho proteínas que ligan diferentes sustratos, ABP (arabinosa), GBP (galactosa/glucosa), SBP, RBP, MBP (sulfato, ribosa y maltosa), LAO (lisina, arginina, ornitina), LIVBP (leucina isoleucina, valina), con constantes de disociación del orden micromolar a nanomolar. A continuación realizaré una descripción de la estructura de las ligadoras de aminoácidos, que para este trabajo, son el modelo de interés.

La estructura observada muestra una sola cadena polipeptídica plegada en forma de dos lóbulos conectados por dos o tres segmentos polipeptídicos cortos. La forma cristalizada sin ligando se presenta en conformación abierta y, en presencia de este, en conformación cerrada. Dichas observaciones permiten creer que el ligando induce un gran cambio conformacional que finalmente es reconocido por el complejo transportador de membrana (Byung-Ha, Jayvardhan Padit, 1993.).

En la tabla 2 aparece una descripción de algunas características de cada proteína. Han sido extraídas de *Echerictia Coli* y *Salmonella Typhimorium*.

Algunas tienen dos cadenas y ambas interactúan con un sustrato, otras una sola cadena. Las cadenas individuales tienen pesos moleculares iguales.

Tabla No. 2. Propiedades de las proteínas periplásmicas bacterianas. *Corresponde al peso molecular de cada una de las cadenas que conforman la proteína.

NOMBRE	Cod. PDB	Conformación	Fuente	Cadenas	No. Aas	P. M.	Resol.
LAOBP	2LAO	Apo	S. Thy.	E	238	26,010	1.9
LAO-Arg	1LAF	Arginina	S. Thy.	E	238	26,	2.06
LAO-Orn	1LAH	Ornitina	S. Thy.	E	238	26,010	2.06
LAO-Lys	1LST	Lisina	S. Thy.	E	238	26,138	1.8
HBP	1HPB	Histidina	S. Thy.	P	238	26,379	2.5
HBP	1HSL	Histidina	E. Coli	A, B	238 *	26,141	1.89
LIVBP	2LIV	leucina	E. Coli	-	346	36,967	2.4
LIVBP	2LBP	Apo	E. Coli	-	344	36,744	2.4
GBP	1GGG	Apo	E. Coli	A, B	238 *	24,933	2.3
GBP-constrc.	1WDN	Glutamina	E. Coli	A	238	24,933	1.94

En la figura 12 aparece el plegamiento de los lóbulos que se considera es un motivo común en todas, caracterizado por un centro de hojas beta rodeadas de alfa hélices, descrito como plegamiento de unión a nucleótidos por Rossman en 1975. (Sack J., et al., 1989)

La ligadora de lisina, arginina y ornitina, con código de PDB, 2LAO, presenta el 70% de identidad con la ligadora de histidina de la misma especie y utiliza el mismo complejo integral de membrana (Byung-Ha, Jayvardhan Padit, 1993.).

El lóbulo más grande consiste de los residuos 1-88 y 195-238 (lóbulo I) y el otro, más pequeño del 93-185 (lóbulo II), están conectados por dos segmentos compuestos por los residuos 89 al 92 y 186 al 194 que, se cree, facilitan el movimiento de los lóbulos, pero no interactúan directamente con el sustrato.

Las interacciones entre el aminoácido y la proteína se caracterizan básicamente por la presencia de puentes de hidrógeno facilitados por los grupos donadores y aceptores de protones, principalmente, con residuos del lóbulo I : D-11, R-77 con sus cadenas laterales; Ser-70, 72, con sus grupos hidroxilo que estabilizan el alfa-amonio y carboxilo de la lisina. Y-14, F-52 generan interacción hidrofóbica gracias a sus anillos aromáticos que rodean entre ellos los grupos metileno del ligando.

Es de anotar que la mayor parte de las interacciones se dan con el lóbulo I lo que permite deducir que probablemente sea suficiente, como está reportado para la ligadora de leucina 2LIV y 2LBP que aparece abierta interactuando con el sustrato, sugiriendo que la función del lóbulo I será asegurar la captura del sustrato. (Byung-Ha, Jayvardhan Padit, 1993.)

El movimiento de cierre es flexible gracias a las interacciones generadas que forman una intrincada red a través de puentes de hidrógeno incluyendo algunas moléculas de agua como mediadores.

Contrario a lo que se esperaría, no se encuentra ningún tipo de interacción, entre los lóbulos, que estabilice, de alguna manera el cierre. Esto podría explicar porque no es permanente. Byung-Ha y colaboradores han postulado un modelo de equilibrio dinámico entre las conformaciones cerrada vacía, abierta vacía, cerrada con sustrato, abierta con sustrato. Incluso este movimiento de cuerpo rígido se da en ausencia del ligando, es decir, el ligando primero, se une al lóbulo I cuando la proteína está abierta, luego el lóbulo I ligado se acerca hacia el II formando las interacciones restantes.

Se ha sugerido que la unión del ligando está asociada al comportamiento cinético y al tiempo de apertura, en ausencia del ligando, el movimiento de cierre bilobular debe ser más inestable y mayor que cuando se da en presencia de ligando. Igualmente, el equilibrio entre las conformaciones ligada cerrada y ligada abierta no es tan grande gracias a que las interacciones favorecen la conformación cerrada, se presenta abierta probablemente debido a que la barrera de energía de activación entre las dos conformaciones es baja (Byung-Ha,

Jayvardhan Padit, 1993.). En la figura No. 13 se comparan las conformaciones ligada con arginina a la izquierda y la libre que muestra el desplazamiento de la conformación cerrada, más notable para los residuos del lóbulo II. La T-121 forma puente de hidrógeno con alfa carboxilo de la arginina y arrastra consigo el puente formado, desde la forma Apo, con L-117 desplazando este residuo considerablemente $\sim 8,84 \text{ \AA}$. Y la Q-122 que en Apo no interactúa con D-161, en la ligada forma puente de hidrógeno entre su amino lateral y el alfa-carboxilo del D-161.

Otra estructura interesante de analizar es la ligadora de histidina con código PDB 1hsl, de plegamiento y conformación bilobular como LAOBP, con un total de 238 residuos y un peso molecular de 26,141. El lóbulo I contiene los residuos del 1 al 8 y 195 al 238, el lóbulo II del 98 al 135, conectados por dos cortos segmentos del 89 al 92 y 186 al 194. Como era de esperarse por su alta identidad con LAO, el valor de RMS de la superposición del esqueleto carbonado de las dos estructuras es $0,62 \text{ \AA}$. (Byung-Ha et al., 1994)

Sus interacciones con la histidina son iguales, intervienen los mismos aminoácidos del Lóbulo I con la excepción de la posición 52 donde aparece una leucina, la cual forma puente de hidrógeno con D-11, que contrario a LAO, no interactúa directamente con el ligando, podría ser que la atracción hidrofóbica del anillo de la histidina sobre la leucina la atrae hacia el D11 que tiende a conservar su interacción con el alfa-amino de leucina o también es probable que interactúe por medio de una molécula de agua.

La arginina en LAO tiene cuatro grupos amino aceptores de protones que interactúan con D-11, S-69–70; mientras que la histidina solo presenta un grupo amino que interactúa con Ser-70 y el alfa-carboxilo como aceptor que interactúa con R-77, S-72 y T-121, reemplazando algunas interacciones electrostáticas por hidrofóbicas con L-117, el anillo aromáticos de Y-14 y los grupos metil laterales de L-71, como aparece en la figura 14. Si las interacciones son similares, la afinidad por un aminoácido determinado en cada proteína parece depender de algunos residuos diferentes en las posiciones 18,52,120,190, 193. Aunque solo la L-52 se relaciona directamente con el ligando, aparentemente no mejora la

interacción con histidina en lugar de fenilalanina. En 1994 se sugirió que el cambio conformacional ocurre a bajo pH donde la afinidad por la histidina es mayor, la cual envuelve el movimiento del D-11 hacia el anillo imidazol protonado del ligando generando un menor ajuste en su posición resultando en una interacción iónica energéticamente favorable. En la estructura cristalizada no se aprecia claramente esta interacción debido al pH de obtención de 9,5. (Byung-Ha., et al.,1994). Esto podría explicar las bajas afinidades de 1HSL por arginina y ornitina, que generarían interacciones hidrofóbicas, más débiles, con L-52. Permitiendo concluir que el factor determinante de la afinidad, más que el tamaño de la molécula, sea la disponibilidad de fuertes interacciones iónicas.

Para el sistema permeasa de histidina se ha postulado un modelo del mecanismo que se esquematiza en la figura 15, en donde la proteína periplásmica sufre un cambio conformacional cuando interactúa con el ligando lo que le permite ser reconocida por un complejo proteico integral de membrana denominado complejo QM, transportando el ligando al interior de la célula con una consecuente hidrólisis de ATP.

Otro de los sistemas permeasa bien estudiado es el de glutamina, la proteína periplásmica más pequeña de 226 residuos, peso molecular de 24,933 Da. y un porcentaje de identidad con las otras de un 30%, lo cual no interfiere con el patrón de interacciones común en todas las ligadoras de aminoácidos. Una L-glutamina en una proporción molar 1:1, la glutamina es encerrada totalmente por los dominios lobulares de la proteína lo cual es verificado por la accesibilidad accesible al solvente de cero.

El grupo alfa-amino de glutamina es estabilizado por la interacción iónicas y tipo puente de hidrógeno con los residuos G-68, T70 y D-157, el alfa-carboxilo con T-70, R-75 y G-119. El grupo amida de la cadena lateral interactúa con D-10, A-67, K-115 y H-156. Las interacciones hidrofóbicas están lideradas por F-13,50 que rodean los dos grupos metileno del ligando, como se aprecia en la figura 16.

Adicionalmente interacciones intra-proteicas forman una red continua que estabiliza suficientemente el cierre de los lóbulos. A-67 y G-68 en puente de hidrógeno con T-70, éste a su vez, con D-157 por medio de una molécula de agua, y la K-115 que en conformación abierta se encuentra a 10Å de del Asp10, en la forma cerrada tienen puente de hidrógeno, actuando como una puerta que encierra totalmente la glutamina. (Sun, Y., et al., 1998) Este fenómeno no se presenta en las dos proteínas estudiadas anteriormente.

A diferencia de las anteriores la ligadora de lisina, isoleucina y valina LIVBP y la específica para leucina LBP con 80% de identidad entre si no se han cristalizado con ligando y se postula un modelo de unión del sustrato en el dominio N-terminal en donde los residuos Y-18, S-79, T-102, generan interacciones tipo puente de hidrógeno con los grupo alfa-carboxilo y alfa-amino del sustrato y los residuos L-77, Al-100,101, F-276 estabilizan los grupos metileno hidrofóbicos de los ligandos. Como son aminoácidos hidrofóbicos, también las interacciones que definen la afinidad del sustrato son de carácter hidrofóbico.

El receptor de aspartato de *Salmonella Typhimorium* es otro de estos sistemas de permeasa que transporta el sustrato para dar inicio a un mecanismo de señalización intracelular complejo. El receptor consiste del dominio de unión a ligando, dos hélices transmembranales y un dominio de señalización citoplasmático, el cual, cumple una importante función en vías de excitación y adaptación de quimiotaxis a través de interacciones con algunas proteínas de señalización citoplasmática. El dominio de unión a ligando es dimérico y compuesto de cuatro alfa-hélices como se observa en la figura 17.

Las dos cadenas se encuentran conectadas por puentes disulfuro y el sitio de unión del ligando se encuentra a más de 60Å de la superficie de membrana ubicado en una interfase entre dos alfa-hélices de una subunidad y una hélice de la otra, en un bolsillo altamente cargado formado por tres argininas, R-73,69 de una cadena y 64 de la otra. (Milburn, M., et al., 1991)

Aunque, ni la estructura ni la secuencia, es similar a las periplásmicas, los tipos de interacciones son parecidos, caracterizadas por predominio de estabilizaciones iónicas,

donador – aceptor facilitadas por argininas, puentes de hidrógeno aportados por S-68 y T-154; y, las interacciones hidrofóbicas entre el metileno del aspartato y F-150, Y-154.

Teniendo en cuenta estos análisis estructurales y evaluando la relativa similaridad de secuencia entre las regiones extracelulares de los receptores de glutamato y estas proteínas se han realizado los correspondientes alineamientos de secuencia de las periplásmicas y la subunidad NR2B del receptor NMDA, con el fin de identificar residuos de interacción comunes, que permitan realizar un modelo similar para este receptor.

4.4 Conceptos sobre Mecánica Molecular (MM)

Gracias al desarrollo de potentes computadoras y de programas que llevan a cabo cálculos teóricos, podemos disponer de representaciones gráficas que nos muestran cómo son las estructuras a nivel molecular que no alcanzamos a discernir con el más potente de los microscopios electrónicos.

Estas representaciones y esquemas de modelos moleculares pueden completar nuestra visión de la estructura de la materia, facilitando la visión estereoscópica de las moléculas, observando de forma directa cómo se relacionan distintas partes de una estructura o mostrando cómo interaccionan y se complementan moléculas como proteínas y ácidos nucleicos o enzimas con sus sustratos. Sin embargo, un mal conocimiento de los principios y modelos teóricos a partir de los cuales se generan estas estructuras teóricas nos podría conducir a una interpretación errónea de las mismas. Además, hay que recordar que trabajamos con modelos que interpretan la realidad física, la cual no tiene por qué coincidir con ellos.

Uno de los métodos de modelización molecular más empleado para generar estos modelos moleculares es la Mecánica Molecular (MM). Su fundamento consiste en expresiones analíticas que expresan la energía total de un sistema en términos de interacciones interatómicas. Los diferentes parámetros de la ecuación se fijan previamente, partiendo de

estudios empíricos tipo resonancia magnética nuclear, análisis conformacional, difracción de electrones, etc. Después, mediante derivaciones sucesivas de la función de energía potencial que define el sistema objeto de estudio se obtienen estructuras optimizadas energéticamente (mínimos de energía locales generalmente). (Machida, K., 1999)

La MM utiliza las leyes de la física clásica para predecir estructuras y propiedades moleculares teniendo en cuenta tres aspectos fundamentales:

- Un campo de fuerza (FF del inglés *force field*) particular está compuesto por un conjunto de ecuaciones que definen como varía el potencial con la posición de los átomos en la molécula.
- Los átomos que definen las características de un elemento en un contexto químico específico son diferentes en función de su posición en el entorno. Por ejemplo, el átomo de carbono en un carbonilo es tratado de diferente forma al átomo de carbono enlazado a tres hidrógenos. Por tanto, el tipo de átomo depende de su hibridización, carga y tipo de átomos a los que se encuentra enlazado.
- Los parámetros que ajustan las ecuaciones y tipos de átomos a los datos experimentales están definidos como *constantes de fuerza*, las cuales dan los valores utilizados en las ecuaciones que relacionan las características atómicas con las componentes de energía y los datos estructurales como longitudes y ángulos de enlace. (Machida, K., 1999)

Existen muchos procedimientos para el análisis por mecánica molecular. Uno de los modelos más utilizados es el de Campos de Fuerza, los cuales definen las interacciones entre todos los átomos dentro de la molécula. Así, la Energía potencial total es la resultante de sumar todas las funciones de Energía potencial de los distintos átomos en la ecuación 1.

$$E_{\text{total}} = E_{\text{enlaces}} + E_{\text{ángulos}} + E_{\text{dihedros}} + E_{\text{Van der Waals}} + E_{\text{electrostáticas}} + E_{\text{enlaces de hidrógeno}}$$

Ec. 1

Aunque no se tienen en cuenta de manera explícita los electrones, los cálculos se basan en la interacción electrón – núcleo y los efectos de los electrones se encuentran implícitos en las ecuaciones.

La energía de los enlaces está dada por la ecuación 2.

$$E_{\text{elec}} = \epsilon_{14} \frac{C q_i q_j}{\epsilon_0 |\vec{r}_{ij}|} \quad \text{Ec.2}$$

Donde

- ϵ_{14} corresponde al factor para interacciones 1-4. Este es cero para 1-2 y 1-3, e igual a 1 para otras.
- C es igual a 2.31×10^{-19} J nm, q_i es la carga del átomo i , q_j la carga del átomo j , ϵ_{14} es la constante dieléctrica especificada en los parámetros del modelo definido.
- $\vec{r}_{ij} = \vec{r}_j - \vec{r}_i$, representan el vector distancia entre el átomo i y j

Para la energía de Van Der Walls se tiene la ecuación 3

$$E_{\text{vdw}} = \frac{A}{|\vec{r}_{ij}|^{12}} - \frac{B}{|\vec{r}_{ij}|^6} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde

- A = constante
- B = constante
- $|\vec{r}_{ij}|$ = distancia entre los átomos i y j

$$E_{\text{bond}} = k(|\vec{r}_{ij}| - r_0)^2 \quad \text{Ec. 4}$$

Donde

- k = constante de resorte para el enlace dado.
- $|\vec{r}_{ij}|$ = distancia entre los átomos i y j
- r_0 = distancia de reposo del enlace dado

Los ángulos descritos entre tres átomos. Los enlaces entre estos átomos se modelan como resortes armónicos y la energía estaría dada por la ecuación 5.

$$E_{\text{angle}} = k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + k_{\text{ub}}(|\vec{r}_{ik}| - r_{\text{ub}})^2 \quad \text{Ec. 5}$$

Donde

- k_θ = constante de fuerza para el enlace dado.
- θ = ángulo calculado entre el vector que conecta los átomo i y j y el vector que conecta los átomos k y j . El ángulo se calcula por la ecuación 6.

$$\theta = \cos^{-1} \left(\frac{\vec{r}_{ij} \cdot \vec{r}_{kj}}{|\vec{r}_{ij}| |\vec{r}_{kj}|} \right) \quad \text{Ec.6}$$

- θ_0 = ángulo en reposo
- k_{ub} = constante de Urey-Bradley que por defecto es cero
- r_{ub} = distancia en reposo

Los ángulos diédricos se modelan a partir de la interacción de cuatro átomos enlazados. Se modelan por un resorte angular entre los planos formados por los primeros 3 átomos. Su energía está dada por las ecuaciones 7 y 8.

$$E_{\phi/l} = k(1 + \cos(n\phi + \delta)) \quad \text{se } n > 0 \quad \text{Ec.7}$$

$$E_{\phi/l} = k(\phi - \delta)^2 \quad \text{if } n=0, \text{ where} \quad \text{Ec.8}$$

- k = constante de fuerza .
- ϕ = ángulo calculado entre el plano formado por los átomos $i, j, y k$ y el plano formado por los átomos $j, k, y l$
- n = periodicidad del enlace especificado
- δ = desviación de la fase especificada en los parámetros.

Existen distintos campos de fuerza dependiendo de las funciones de Energía potencial (denominadas parámetros del campo) que se incluyen dentro de la ecuación determinada. Unos campos definen o examinan mejor pequeñas moléculas orgánicas, mientras que otros están más preparados para proteínas y otros biopolímeros. El campo de fuerza utilizado es la base de la minimización energética mediante Mecánica Molecular, todo parámetro que no esté incluido en la ecuación no será tomado en cuenta para el cálculo, por tanto, una misma molécula minimizada con dos campos distintos dará una conformación final distinta. Los programas utilizados en este trabajo se basan en este modelo.

Las minimizaciones de energía hacen referencia a la energía potencial de la estructura teniendo en cuenta sus coordenadas, la sumatoria de sus fuerzas de enlace e intermoleculares en un estado estacionario con base en la premisa de que los átomos son partículas puntuales y con carga, las cuales interactúan de acuerdo con la distancia que las separa.

Como es motivo del trabajo evaluar las interacciones intermoleculares es conveniente hacer una revisión general de estos conceptos.

4.5 Fuerzas intermoleculares:

Las fuerzas entre partículas cargadas o átomos pueden ser de atracción y repulsión, y, dependen de la distancia entre las moléculas. Se clasifican de dos tipos: De corto alcance, aquellas cuya energía disminuye exponencialmente con el incremento de la distancia y son lo suficientemente fuertes como para formar los enlaces característicos de las moléculas. Las de largo alcance que se relacionan inversamente a la distancia, menos fuertes y determinan las interacciones entre las moléculas, estas son el interés de este trabajo.

Se clasifican, a su vez, en electrostáticas, inducción y dispersión. Las primeras se estudian como la interacción entre la distribución de cargas estáticas de dos moléculas, son aditivas, es decir, puede ser la sumatoria de todas las fuerzas entre la distribución de cargas entre una molécula dada y las moléculas de los alrededores. Dentro de estas encontramos los puentes de hidrógeno y puentes salinos muy fuertes y determinan la mayoría de las interacciones ligando – receptor.

Las de inducción surgen a partir de la distorsión de las cargas de una molécula en un campo eléctrico generado por su alrededores, son atractivas y no aditivas ya que los campos de algunas de las moléculas vecinas pueden reforzarse o cancelarse.

Las de dispersión dependen de las fluctuaciones de distribución de carga de las moléculas a medida que los electrones se mueven y este movimiento llega a correlacionarse de tal manera que las configuraciones de baja energía son favorables y las de alta desfavorables.

Estas reúnen las llamadas fuerzas de Van Der Waals, London e hidrofóbicas que en segundo lugar también son importantes en la afinidad de un sustrato en un sitio de interacción. (Stone, A., 1997)

4.6 Conceptos generales sobre los programas utilizados

4.6.1 Programas para el alineamientos de secuencias. www.expasy.ch

Los alineamientos son una metodología de búsquedas en bases de datos o comparación entre secuencias ya conocidas. El principal problema en la comparación de secuencias consiste en encontrar todas las zonas de similaridad significativas entre dos o mas secuencias y determinar que es significativo cuando se habla de secuencias biológicas. Para cubrir la mayoría de las necesidades hay varios enfoques y distintos programas que se pueden utilizar. La sensibilidad de lo distintos programas a la hora de realizar la búsqueda de secuencias en las bases de datos dependen del algoritmo empleado. Estos algoritmos generan matrices estadísticas que permiten alinear la secuencia problema con otras parecidas. Las matrices mas simples sacrifican cierto grado de significación en la comparación a cambio de una mayor velocidad. Por tanto la velocidad y sensibilidad de la búsqueda va a depender de la complejidad del algoritmo empleado y de la matriz que genere.

Muchos programas permiten seleccionar diferentes matrices, pero es recomendable utilizar la que por defecto nos indica el programa que vamos a utilizar. En este caso donde el interés es comparar dos secuencias es recomendable la matriz BLOSUM 62 que viene por defecto en el programa y es capaz de reconocer sustituciones conservadas como por ejemplo lisina por arginina, las cuales se indican con un punto entre las secuencias y con dos puntos entre los residuos idénticos, además de un porcentaje que indica la similaridad.

Si el interés es comparar múltiples secuencias ClustalW permite alinear la totalidad de las secuencias sin generar espacios vacios o *gaps* , identificando los residuos idénticos y similares y dando un porcentaje de similaridad que permite predecir que tan diferentes son las secuencias.

Si lo que se busca es segmentos de homología entre dos secuencias LALING permite comparar dos secuencias y determina regiones de homología con valores de porcentaje de similitud para cada región.

4.6.2 Spdb-viewer. www.ncbi.nlm.nih.gov

Es una aplicación que convierte las coordenadas del PDB en estructuras tridimensionales que indican los átomos y los enlaces entre ellos. Presenta una interfase interactiva que permite visualizar las moléculas en diferentes formas de representación de su estructura secundaria y terciaria. Las proteínas pueden ser superimpuestas para realizar alineamientos estructurales, comparar sitios activos, determinar variaciones entre dos conformaciones diferentes, realizar mutaciones de residuos de aminoácidos calcular puentes de hidrógeno, potencial electrostático y realizar minimizaciones de energía en estructuras rediseñadas, entre otras funciones.

El programa está fundamentado en los principios de la mecánica molecular para la realización de todas sus funciones. Fue desarrollado por el Centro de investigaciones de la Glaxo Welcome en Génova, Italia. (Gueex, N, 1997)

4.6.3 GRAMM (*Global Range Molecular Matching*) versión 1,03. Reco3.ams.sunysb.edu/gramm/

Este programa permite predecir la estructura de un complejo de interacción entre dos proteínas, dos hélices transmembranales, una proteína y un ligando, entre otras. Desarrolla una búsqueda a través de rotaciones y traslaciones de las moléculas y localiza un área de mínimo global de energía intermolecular para las estructuras en diferentes posiciones.

El programa realiza cálculos de alta resolución que miden las distancias geométricas entre todos los átomos estudiados con significativo gasto de tiempo de máquina, y, de baja resolución, cuando los cálculos son entre estructuras mas generales o superficiales, en este

caso es mucho más rápido que el anterior. Estos parámetros son susceptibles de modificar para cada caso.

La geometría molecular se basa en la estructura tridimensional de las moléculas y, en muchos complejos proteicos, revela un solapamiento entre las superficies moleculares, determinando la naturaleza de interacciones específicas en el complejo. Este fundamento es utilizado en el algoritmo de este programa, el cual se basa en una proximidad geométrica que permite identificar una superficie molecular complementaria.

El algoritmo se basa en una representación digital de las moléculas derivadas de las coordenadas atómicas, para el cálculo de una función de correlación dada por las posiciones de los átomos en una malla tridimensional. Solo se tendrán en cuenta las posiciones superficiales de cada molécula que puedan entrar en contacto, entre las moléculas interactuantes. Las funciones discretas, siendo a y b las dos moléculas, están representadas por:

$a_{l,m,n} = 1$ dentro de la molécula; 0 fuera de la molécula

$b_{l,m,n} = 1$ dentro de la molécula; 0 fuera de la molécula

Los subíndices l,m,n son los índices de las posiciones en la malla y pueden tomar valores desde 1 hasta N. Algún punto en la malla es considerado dentro de la molécula si hay, el menos, un núcleo atómico en una distancia r de otro; r es el radio atómico de Van Der Waals. Para distinguir posiciones después del acoplamiento de las moléculas resulta otra función dada por:

$\hat{a}_{l,m,n} = 1$ en la superficie de la molécula; ρ dentro de la molécula y 0 fuera

$\hat{b}_{l,m,n} = 1$ en la superficie de la molécula; δ dentro de la molécula y 0 fuera

Esta función determina las áreas superficiales y la superficie es definida como una capa finita limitante entre el interior y el exterior de la molécula. Los parámetros ρ y δ describen el valor de los puntos dentro de las moléculas.

El acoplamiento de las moléculas está determinado por la función final de correlación entre las funciones discretas a y b definida como:

$$c_{\alpha\beta\gamma} = \sum_{l=1}^N \sum_{m=1}^N \sum_{n=1}^N a_{l,m,n} * b_{l+\alpha, m+\beta, n+\gamma}$$

Donde α , β y γ son el número de pasos de la malla por los cuales, la molécula b es acoplada a la molécula a en cada dimensión. Si no hay contacto entre las dos moléculas el valor de la función de correlación es cero, si hay contacto entre las superficies, el valor es positivo. (Katchalski, E., et al., 1992)

De esta manera el programa consume una gran cantidad de tiempo de cálculo y arroja modelos en las probables posiciones.

5. MATERIALES Y METODOS

En este trabajo los materiales corresponden a las coordenadas geométricas de las proteínas a estudiar obtenidas de la base de datos *Protein Data Bank (PDB)* , un computador PC, IBM Aptiva , modelo 2153E1L.

Los métodos utilizados son los programas de alineamiento de secuencias ClustalW y LALING disponibles en Internet, (www.expasy.ch) el programa Spdviewer versión 3,7b para el análisis estructural y de interacciones, y, Gramm versión 1,03 para la realización de los “docking” o simulación del sitio y tipo de interacción ligando – receptor.

A continuación se hace una descripción de los métodos utilizados en cada etapa del trabajo.

5.1 Obtención de coordenadas de las proteínas del PDB (Protein Data Bank).

El Protein Data Bank, PDB, es la base de datos de coordenadas de proteínas con estructura resuelta por difracción de rayos X y Resonancia magnética nuclear. Las estructuras utilizadas para este trabajo todas fueron resueltas por rayos X.

Para la realización de los análisis de los sitios de interacción y sus respectivos ligandos se obtuvieron las coordenadas de las proteínas periplásmicas bacterianas, LAOBP (ligadora de lisina, arginina y ornitina) en la forma apo y con cada uno de los sustratos, LIVBP (ligadora de leucina, isoleucina, valina), QBP (de glutamina), HBP (de histidina) y DBP (de aspartato). Igualmente para el dominio, S1S2 del receptor de glutamato GluR2, apo y con los agonistas AMPA, KA, glutamato y antagonista DNQX como modelos de comparación en la tabla 3 se indican los códigos de las proteínas estudiadas.

Tabla No. 3. Códigos de proteínas estudiadas

NOMBRE	CODIGO	SUSTRATO
LAOBP - APO	2LAO	-
-	1LST	Lisina
-	1LAG	Arginina
-	1LAH	Ornitina
LIVBP - APO	2LIV	-
HBP	1HSL	Histidina
QBP - APO	1GGG	-
-	1WDN	Glutamina
Asp-BP	1VLT	Aspartato
IGluR2 - APO	1FTO	-
-	1FTJ	Glutamato
-	1FTK	Kainato
-	1FTM	Ampa
-	1FTL	Dnqx

5.2 Estudio de los residuos de interacción con los ligandos.

Una vez obtenidas las coordenadas de las proteínas de interés se procede al análisis de sus estructuras mediante el programa Spdb-viewer.

Para cada estructura se realizó la revisión y la identificación de los aminoácidos que interactúan con el sustrato determinado, incluso el tipo de interacción a partir de la medida de distancias entre grupos funcionales y la definición de los puentes de hidrógeno presentes. Se compararon los cambios conformacionales entre la estructura apo y la ligada

y el movimiento de los residuos lo que indica la diferencia estructural y espacial entre las formas apo y ligadas.

5.3 Alineamiento de secuencias.

Al mismo tiempo se obtuvieron las secuencias correspondientes a las estructuras analizadas de PDB. Se obtuvieron del banco de secuencias del NCBI (*National Center of Bioinformatic*), las periplásmicas, constructo quimérico de iGluRs, y NR2B .

Se realizó un alineamiento de las secuencias NR2B de rata (*Ratus norvegicus*) con código GI-548672, ratón (*Mus musculus*) código GI- 20834664 y humano (*Homo sapiens*), código GI- 14548162; con el fin de seleccionar solamente una, que pudiera ser modelo de las otras secuencias. Se escogió la de rata, que hasta el momento ha sido la más estudiada y su diferencia con respecto a las otras no es tan significativa.

Adicionalmente se alinearon las secuencias de la subunidad NR2B del receptor en rata, contra 2LAO, 1GGG y 1VLT, ligadoras de aminoácidos en bacterias; para encontrar regiones de homología que permitieran predecir sitios de interacción en zonas extracelulares.

Los alineamientos de las NR2B se realizaron con el programa ClustalW bajo los parámetros de la matriz BLOSUM 62 y bajas penalizaciones en *gaps* . El alineamiento de cada una de las secuencias de las periplásmicas y NR2B con el programa LALING, a partir del cual se obtienen regiones de alta homología con su correspondiente valor en porcentaje de identidad, lo cual permite un mayor acercamiento al modelo estructural del receptor. El programa utiliza por defecto la matriz BLOSUM 62.

5.4 Diseño del modelo de la región de interacción con agonistas para NR2B.

Una vez hechos los alineamientos y definidas las regiones transmembranales previamente resueltas con programas de predicción por L. Lareo, se realizaron las mutaciones de los residuos en las proteínas molde, 1GGG y 2LAO, con estructura, por los residuos encontrados en NR2B en zonas extracelulares, mediante el programa Spdb-viewer. Con 1VLT no se prosiguió porque el alineamiento resultó en una región intracelular de la secuencia NR2B. A cada una de la proteínas mutadas se le realizó la minimización de energía hasta obtener el mínimo que correspondería a la estructura más estable.

Con las nuevas estructuras obtenidas se procede a realizar el *docking* contra el glutamato y el NMDA. Se llevó a cabo con el programa GRAMM (*Global Range Molecular Matching*) versión 1,03.

El *docking*, corresponde a la simulación de la interacción de dos moléculas, permitió predecir las posibles interacciones y sitios de unión del ligando con la región extracelular diseñada por mutación a partir del alineamiento de secuencias. Una vez obtenidos los modelos del programa GRAMM se realizó minimización de energía y el análisis de las interacciones con los ligandos con el programa Spdb-viewer.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Comparación de los residuos de interacción con ligando en proteínas periplásmicas y S1S2 de GluR2.

Los residuos de interacción en la ligadora de lisina, arginina y ornitina, con cada uno de estos sustratos identificada con el código PDB, 1LAF, 1LAH y 1LST respectivamente, la ligadora de histidina, 1HSL, de aspartato, 1VLT, y de glutamina 1WDN, se presentan en la tabla 4 indicando los residuos comunes con las estructuras de GluR2 ligada a glutamato .

Tabla No.4. Residuos de aminoácidos que interactúan con los ligandos en cada estructura de proteínas periplásmicas y GluR2. Aparecen en negrilla los residuos comunes

1WDN(Gln)	1VLT (Asp)	1HSL(Hys)	1LST(Lys)	1LAF(Arg)	1LAG(Hys)	1LAH(Orn)	iGluR2
D10	R64	D11	D11	D11	D11	D11	E13
P13	S68	Y14	Y14	Y14	Y14	Y14	Y61
P50	Y149	L52	P52	P52	P52	P52	P89
A67	P150	S69	S69	S69	S69	S69	T91
G68	A151	S70	S70	S70	S70	S70	R96
T70	Q152	L71	L71	L71	L71	L71	L138
R75	T154	S72	S72	S72	S72	S72	S142
K115	R69	R77	R77	R77	R77	R77	T143
T118	R73	L117	L117	L117	L117	L117	T174
G119		S120	S120	S120	S120	S120	E193
D122		T121	T121	T121	T121	T121	M196
		Q122	Q122	Q122	Q122	Q122	Y220
		D161	D161	D161	D161	D161	

Aunque la similitud de secuencia entre las periplásmicas y el constructo S1S2 de GluR2 es relativamente bajo, las interacciones pueden ser comparables con las del receptor.

De acuerdo con las comparaciones realizadas, mediante el programa Spdb-viewer, se identificaron residuos comunes entre los dos tipos de proteínas, como la R-77 en periplásmicas que es uno de los residuos importantes ya que forma dos puentes de hidrógeno entre su grupo amino lateral y el alfa carboxilo del sustrato, también está presente en S1S2 como R-96 formando puentes de hidrógeno con el alfa carboxilo de glutamato, AMPA y kainato, con DNQX interactúa con los grupos ceto del anillo en

posición 1 y 2. Además de la arginina, el carboxilo del sustrato, es estabilizado por T-121 y S-72, en periplásmicas y sus análogos en el receptor, T-91 y S-142, a excepción de DNQX donde la S-142 está tan alejada que no facilita la interacción; cabe recordar que éste es un antagonista y no induce suficientemente el cierre de los lóbulos como se aprecia en la figura 18.

El alfa amino del ligando en las periplásmicas es estabilizado por puentes de hidrógeno con el alfa carboxilo de S-70, el hidroxilo de S-72 y el grupo carboxilo lateral de D-161. Por su parte el alfa amino del glutamato y de AMPA se estabiliza con alfa carboxilo de T-91, que puede ser análogo de la S-70 y el grupo carboxilo lateral de E-193 análogo a D-161. En el receptor no existe otra serina pero si la P-89 que con su alfa carboxilo forma el otro puente. El alfa amino de kainato hace parte del anillo imidazol y hace que solo pueda formar dos puentes con P-89 y E-193 como se observa en figura 19.

Los grupos laterales son diferentes, mientras la lisina, arginina y ornitina tienen grupos amino laterales; el glutamato y agonistas tienen grupos carboxilo y el DNQX dos grupos nitro, lo que hace que los residuos interactuantes sean diferentes.

De todas maneras la parte comun entre los sustratos es el alfa amino y carboxilo que es de esperar que interactúen con un mecanismo similar entre donadores y aceptores de protones formando puentes de hidrógeno y otras interacciones electrostáticas más débiles. Los grupos metilenos, no polares, de los sustratos también facilitan la fijación por interacciones hidrofóbicas con residuos aromáticos o de cadenas hidrofóbicas. En las periplásmicas se encuentran la F-52 y Y-14 rodeando tres grupos metileno y L-71,117, esta última leucina se desplaza 7,03 Å debido no solo al ligando, sino a la acción de arrastre ejercida por la T-121 y D-161 que, al hacer puentes de hidrógeno con el sustrato, modifica sus interacciones con Q-122 y S-120. Q-122 cambia su interacción con S-120 por D-161 en una rotación del carbono amida lateral, S-120 genera una nueva con el hidroxilo lateral y alfa-carboxilo de L-117, induciendo el significativo desplazamiento final de este aminoácido hidrofóbico.

En contraste, en GluR2 la L-138 análogo a L-117 se desplaza solo lo suficiente debido a la atracción hidrofóbica como se aprecia en las figuras 20 y 21.

La suma de todos estos movimientos y rotaciones de enlaces en toda la proteína generan finalmente, un alto consumo energético variando su energía potencial y presentando la conformación necesaria para producir la apertura del canal.

Además, no solo los residuos del receptor sufren modificaciones, el sustrato también deberá buscar la conformación más estable y de mayor interacción con el receptor. De ahí que estos sustratos sean flexibles, aunque AMPA y DNQX no varían demasiado. En la figura 22 se aprecia, el cambio estructural y entre menos sustituyentes voluminosos, como anillos, la estructura en más flexible.

Fundamentalmente, los movimientos se reflejan en rotaciones debidas a las interacciones de los grupos ácido y amino o nitro en DNQX. En la figura 22 se muestra como el glutamato y AMPA, por ejemplo, tienen una variación en cuanto a la distancia entre los grupos carboxilo los cuales se acercan, aproximadamente 0,2 Å, en la interacción con el receptor facilitando la formación de los puentes de hidrógeno y el desplazamiento del metileno beta hacia el anillo aromático de Y-61.

Aunque la similaridad entre periplásmicas y el receptor en la subunidad S1S2 no es elevada, los residuos que fijan el sustrato son comunes como la R-96, S-142, T-91, L-138, D-61, análogos en el receptor. De ahí que en los alineamientos con NR2B se busque encontrar no solo regiones homologas sino que existan aminoácidos similares que permitan el patrón de interacciones hasta ahora definidos en terminos de interacciones electrostaticas tipo puentes de hidrógeno y algunas de carácter hidrofóbico.

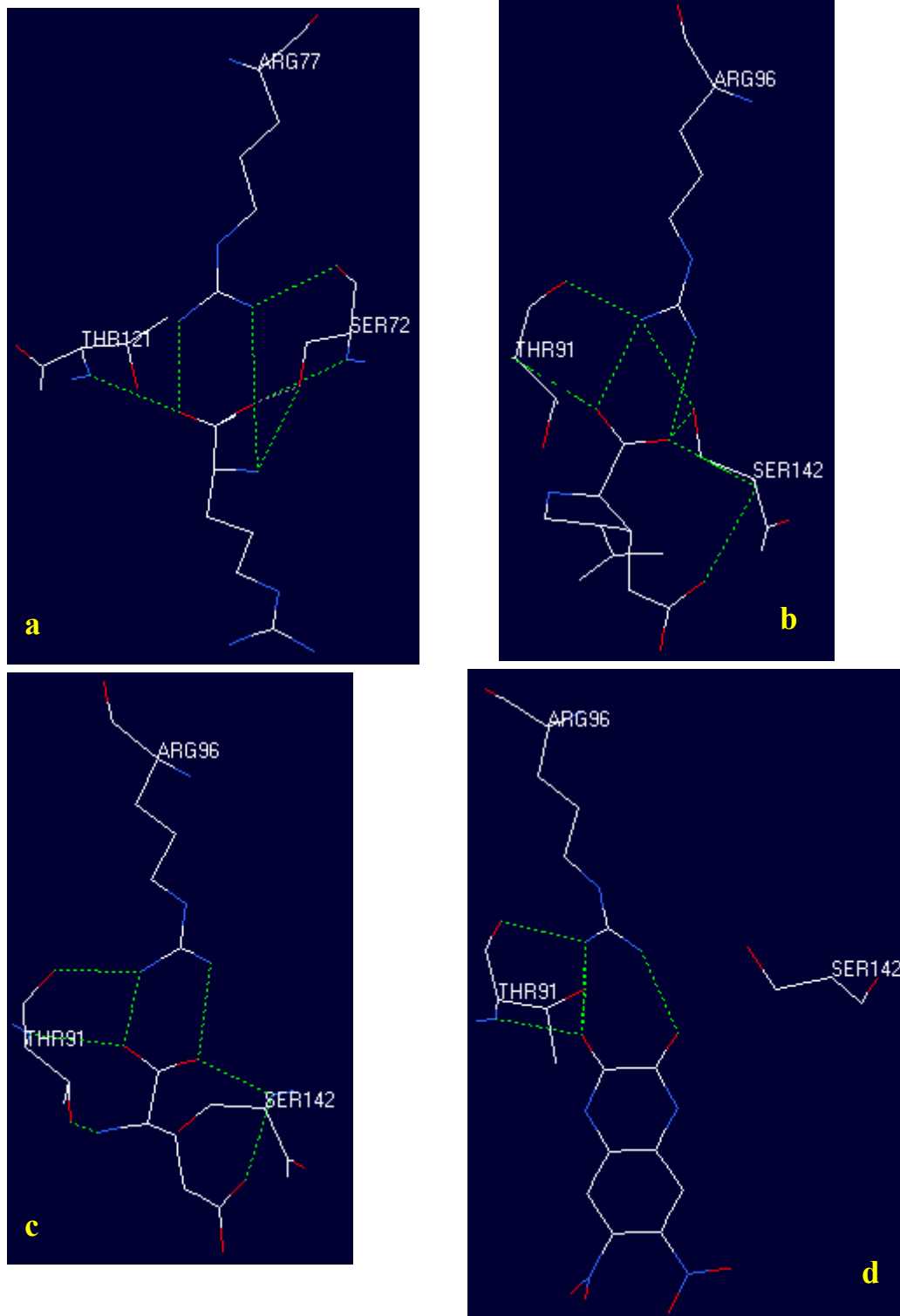


Figura No. 18. Interacciones de alfa carboxilos. a) Arginina en ILAF, b) Kainato, c) glutamato y d) DNQX.

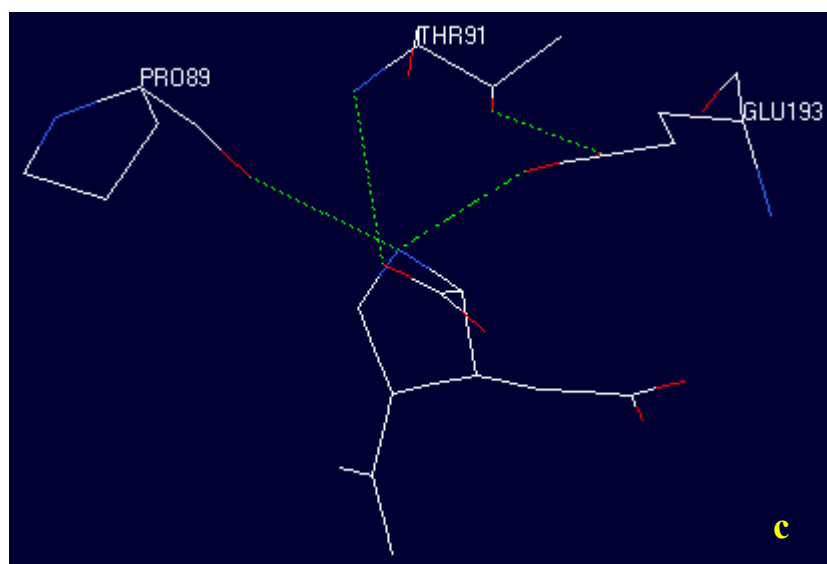
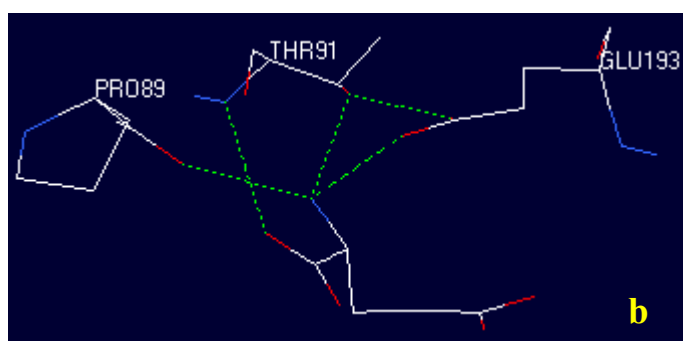
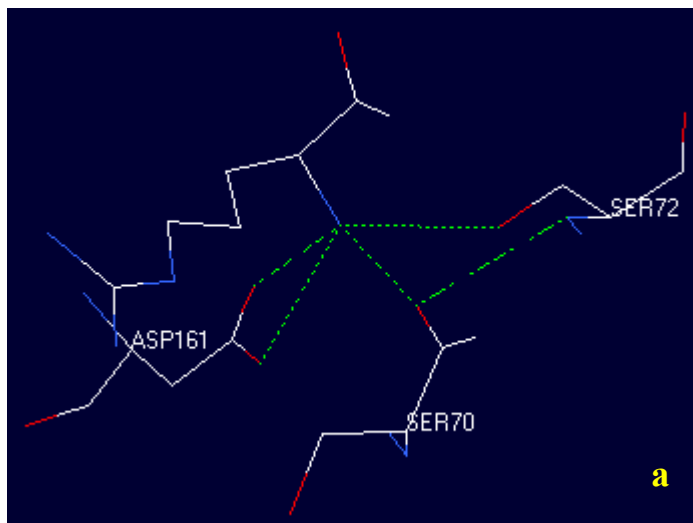


Figura No. 19. Interacciones de alfa amino. a) Arginina, b) glutamato, c) Kainato

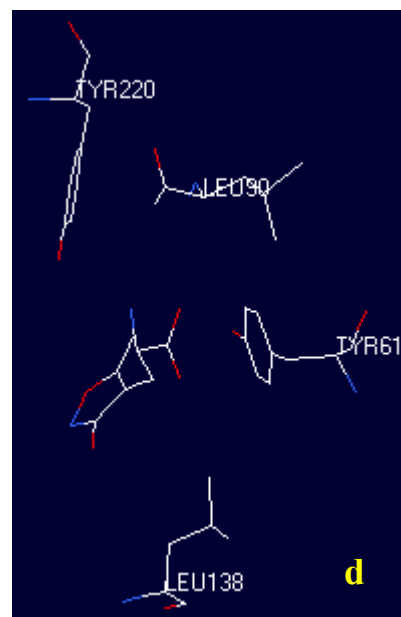
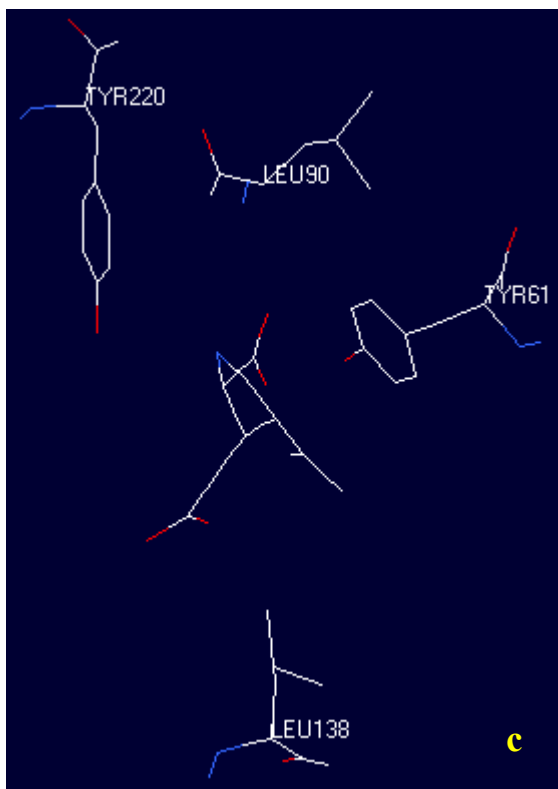
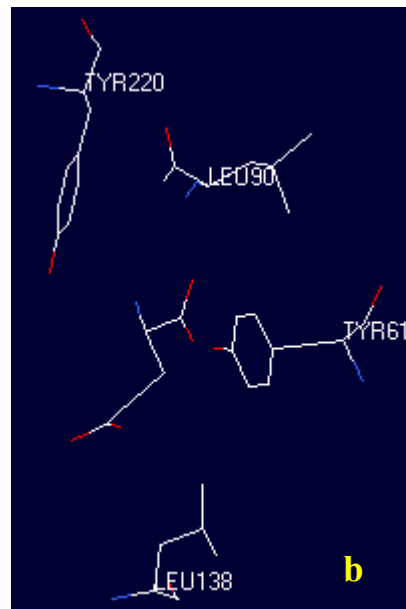
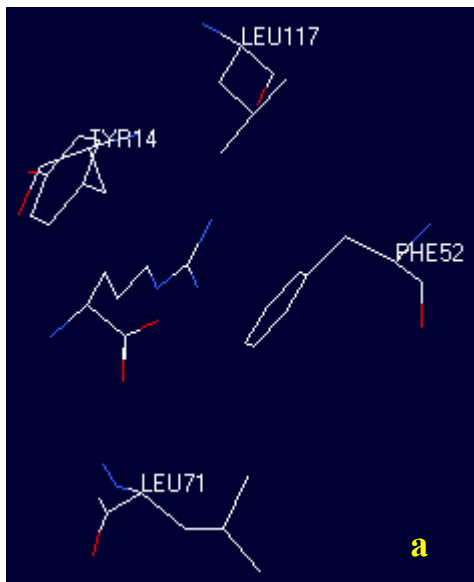


Figura No. 20. Interacciones hidrofóbicas. a) Arginina, b) glutamato, c) Kainato, d) AMPA

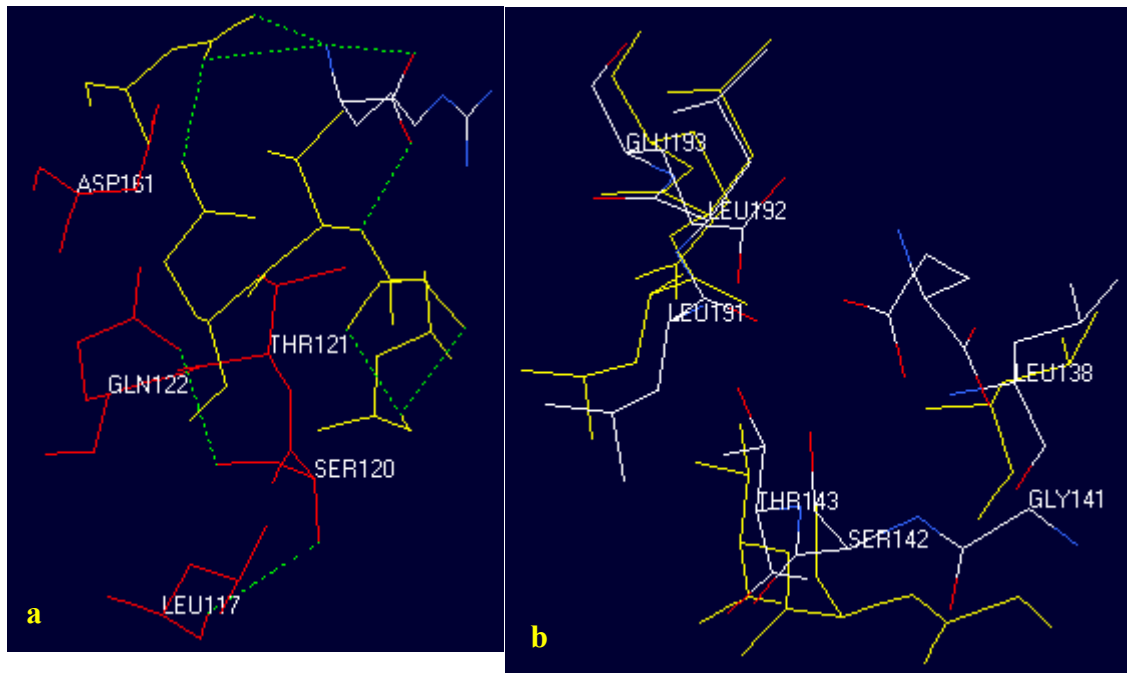


Figura No. 21. Desplazamiento de L- 138. a) Ligadora de arginina, en rojo, la estructura de la proteína libre, en amarillo, el desplazamiento b) GluR, SiS2 con glutamato, en amarillo libre, en colores por átomos el desplazamiento.

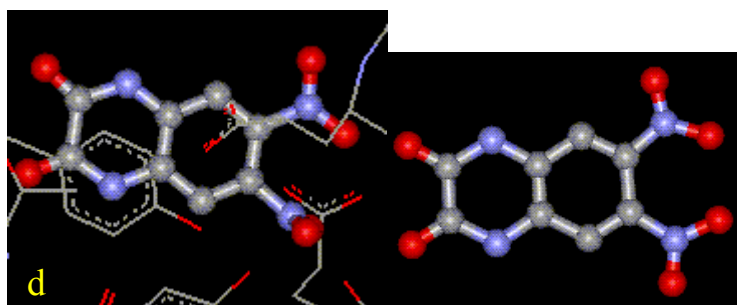
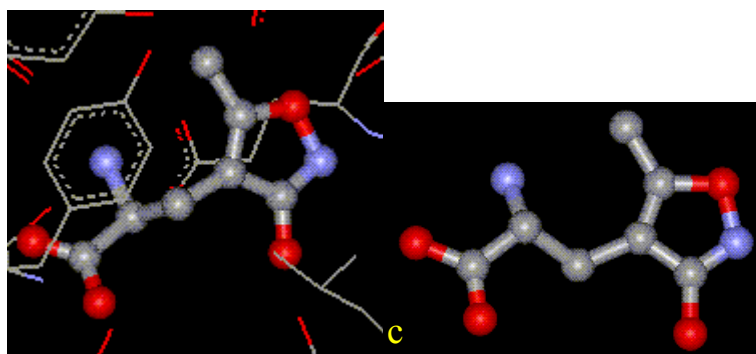
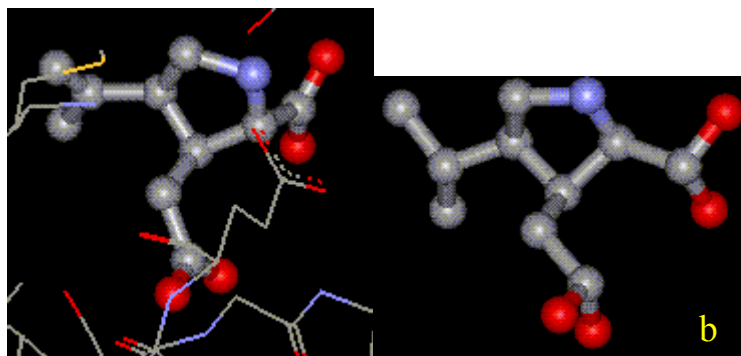
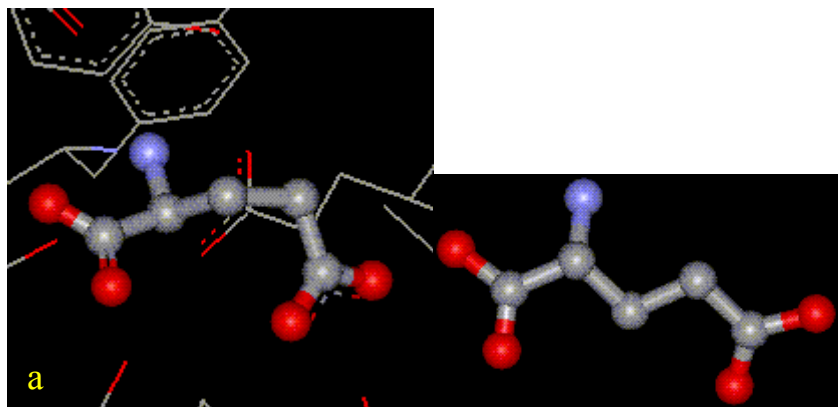


Figura No. 22. Flexibilidad de ligandos. Interactuando y libres. a) glutamato b) kainato c) AMPA d) DNQX

6.2 Alineamiento de secuencias.

En el anexo 1 y 2 aparecen los alineamientos entre 2lao, 1ggg y la subunidad NR2B indicando las regiones de mayor homología con sus correspondientes porcentajes. En el anexo 3, el alineamiento de las secuencias de la subunidad NR2B de las diferentes especies, rata (*ratus norvegicus*), ratón (*mouse*), y humano (*homo-sapiens*) donde se encontró que presentan una similaridad del orden del 95%; por lo cual se trabajó con la secuencia de rata, que salvo algunos residuos diferentes, puede ser utilizada para generar un modelo bastante aproximado al funcionamiento humano y los desarrollos experimentales pueden corroborarse más fácilmente. En el anexo 4 aparece el alineamiento de las subunidades A, B, C y D, el cual presenta mayor diferencia en algunas regiones, aunque, en el fragmento extracelular identificado de interacción con el ligando se presenta bastante similaridad como se observa coloreado en el anexo.

Del alineamiento de las periplasmicas 2LAO y 1GGG con NR2B se encontró similaridad en promedio del 25 al 35 % . En la tabla 5 se muestran los porcentajes de similaridad. Para 1VLT el porcentaje fue mucho menor, de 5,39% y la totalidad de la secuencia fue alineada en la región intracelular por lo cual no se continuó el estudio con esta proteína.

Tabla No 5. Secuencias homólogas en NR2B

ABP	Sec. NR2B	% de identidad
2lao	721 - 792	28,20
	490 - 548	16,90
	716 - 737	43,50
1ggg	494 - 545	32,70
	614 - 797	25,90
	261 - 283	47,80

6.3 Diseño del modelo estructural.

De los alineamientos realizados y con base en el modelo reportado por Seeburg de la existencia de cinco regiones transmembranales, el amino terminal extracelular y el carboxi

intracelular, se buscaba encontrar en los alineamientos de secuencias homología en zonas extracelulares para predecir la interacción de los agonistas.

Los resultados de los alineamientos mostraron claramente tres regiones de homología: En 2LAO, una con 43.5%, pequeña ubicada entre las regiones transmembranales TM4 y TM5 otra con 28,2%, también entre las zonas transmembranales y la región amino terminal con 16.9%.

1GGG presenta una pequeña con 47,8% en la zona muy externa del amino terminal, razón por la cual no se utilizó como molde, otra, más cerca al límite membranal, con 32.7% y entre las regiones transmembranales TM4 y TM5 un fragmento con 25.9%.

De las dos, 1GGG presentó cualidades para ser seleccionada como molde, ya que presenta dos regiones de tamaños significativos y con porcentajes superiores a 2LAO, adicionalmente su ligando, la glutamina, presenta estructura similar al glutamato solo varía el grupo carboxilato en el glutamato por un grupo amida en la glutamina, lo que permite pensar que los patrones de interacción con el receptor sean muy parecidos.

Los dos fragmentos de 1GGG fueron mutadas por los correspondientes residuos de NR2B. Para la región amino terminal se tomo como molde el fragmento con 32,7% de identidad y para la zona entre las regiones transmembranales TM4 y TM5 , el fragmento con 25,9% de identidad. En la figura 33 aparece la secuencia de la subunidad NR2B de rata indicando las regiones transmembranales y extracelulares de interés. En verde se indica la región extracelular homóloga con 1GGG.

Los dos fragmentos seleccionados fueron apareados por “*docking*” con glutamato y NMDA. Cada uno arrojó de tres a cuatro modelos diferentes, de los cuales se seleccionaron los que mostraban la interacción del ligando más aproximada al comportamiento observado en GluR2 y periplasmicas previamente estudiadas.

6.3.1 Modelo para la región amino terminal.

De los resultados obtenidos para la región amino terminal y a partir del *docking* con glutamato y NMDA, se obtuvieron los siguientes modelos escogidos de acuerdo con el tipo de interacciones que determinarían afinidad según el comportamiento evaluado en otras proteínas.

6.3.1.1 “*Docking*” con glutamato.

Para el glutamato se obtienen cuatro modelos de interacción en dos cavidades diferentes, una cerca de una hélice pequeña que se llamará hélice I, y otra entre las dos hélices, cerca de la hélice II. Las uniones están mediadas por interacciones de carácter electrostático facilitadas por los grupos carboxilo lateral, α -amino y α -carboxilo. En la figura No 23 se observa el primer modelo. El glutamato interactúa en un bolsillo mediante interacciones electrostáticas entre su carboxilo lateral y el amino lateral de R-519 observándose por el solapamiento de las superficies de Van Der Waals, el α -amino hace puente de hidrógeno con el hidroxilo de S-520 y la cadena lateral de L-513 favorecen su estabilidad por hidrofobicidad. El α -carboxilo queda expuesto fuera del bolsillo lo que podría indicar uniones mediadas por moléculas de agua.

En el segundo modelo, el glutamato interactúa en el mismo sitio, pero el grupo α -amino está expuesto al exterior. Esto hace que el hidroxilo de S-520 se desplace 0,76 Å con respecto a su posición en el modelo 1 y, por lo tanto, no presente interacción alguna. R-519 presenta mayor interacción que en el modelo anterior, formando puente de hidrógeno con el carboxilo lateral del glutamato y el α -carboxilo, ahora, forma puente de hidrógeno con el amino lateral de N-516, las interacciones hidrofóbicas con la leucina son las mismas, como se observa en figura 24.

En el tercer modelo, el glutamato se une más externamente del bolsillo entre las dos hélices, aunque la hélice II es la que determina la unión, como se observa en la figura

No.25. La N-495 presenta un puente de hidrógeno entre su amino lateral y el α -carboxilo del glutamato, el α -amino interactúa formando dos puentes de hidrógeno con los carbonilos de W-494 y N-495 en el esqueleto carbonado y el W-494, además, favorece la interacción de carácter hidrofóbico. El carboxilo lateral queda expuesto hacia la hélice I interactuando muy débilmente con R-519. Este mecanismo permite suponer que existe un movimiento pequeño del esqueleto carbonado facilitado, a su vez, por el puente de hidrógeno del amino con asparagina en este sitio.

En el cuarto modelo, el glutamato se ubica mucho más externamente hacia la hélice II, similar al modelo anterior, pero se ha desplazado aproximadamente 3Å. Esto hace que no presente interacción hidrofóbica significativa con W-494. El carbonilo de N-495 continúa formando puente de hidrógeno con el α -amino del glutamato y su α -carboxilo forma puente con el amino de G-498 en el esqueleto carbonado. El carboxilo lateral queda expuesto hacia el exterior como se observa en la figura No. 26.

De acuerdo con estas observaciones el modelo que más se aproxima a una estructura estable es el segundo, ya que el glutamato se encuentra formando dos puentes de puentes de hidrógeno con cadenas laterales de los residuos R-519 y N-516, además de otras interacciones de carácter electrostático determinadas por el esqueleto carbonado y las hidrofóbicas con L-513. En los otros modelos las interacciones están menos definidas, ya que se encuentran determinadas solo por interacciones con la cadena carbonada e hidrofóbicas, aunque el esqueleto carbonado podría desplazarse levemente, solo sucede inducido por desplazamientos de residuos mediante interacciones electrostáticas. Además la R-519 y la N-516 son residuos conservados en todas la subunidades A,B,C, y D.

6.3.1.2 “Docking” con NMDA.

Para NMDA se obtuvieron tres modelos. En el primero NMDA se ubica cerca de la hélice I, formando puente de hidrógeno entre su carboxilo lateral y el amino lateral de R-519, el α -amino interactúa levemente con el hidroxilo de S-520 y el α -carboxilo se encuentra

expuesto hacia el exterior donde podría presentar interacciones, nuevamente, mediadas por moléculas de agua, como se observa en la figura No. 27.

En la figura 28, el segundo modelo muestra como NMDA se ubica hacia fuera en la hélice II con el carboxilo lateral expuesto hacia el exterior, el α -carboxilo forma puente de hidrógeno con el amino de G-498 en el esqueleto carbonado, al igual que el α -amino interactúa con el carbonilo de N-495 y el W-494 aporta una interacción hidrofóbica. Esta unión es poco estable y específica, ya que no existen interacciones adicionales que favorezcan el movimiento del esqueleto carbonado.

En el tercer modelo NMDA se une en un sitio sobre la parte externa de la hélice I interactuando solamente por acción de los grupos amino de la R-519, el carboxilo lateral se orienta hacia el exterior, el α -amino no presenta interacciones electrostáticas con ningún residuo, está muy lejos de N-515 que podría ofrecer un grupo carbonilo, figura 29.

Teniendo en cuenta que el NMDA es agonista de glutamato en este receptor y que se cree que interactúan en un mismo lugar con un mecanismo similar, de los tres modelos el que mejor se ajusta es el primero, que presenta puente de hidrógeno con la R-519, al igual que el glutamato, pero con interacción diferente del α -amino que ya no hace puente con N-515 sino que se ha desplazado para interactuar con S-520. En la figura 30 se observa la superposición de las estructuras.

6.4 Modelo para la región entre las zonas transmembranales TM4 y TM5

Para la región entre las zonas transmembranales TM4 y TM5, la zona II, a partir del alineamiento con 2LAO, se realizaron los *docking* con glutamato y NMDA. Resultaron dos modelos para glutamato y uno para NMDA; pero no mostraron interacciones favorables que permitieran una posible unión por esta región. A continuación se analizarán las razones que descartan la posible unión de los ligandos en este sitio.

En el caso del glutamato los dos modelos presentaron una ubicación cerca de una hélice, muy distante de los residuos probables de interacción, K-60,63. Esto disminuye la probabilidad de una interacción estable, como se observa en la figura 31.

Para NMDA el modelo muestra interacción electrostáticas por solapamiento de las superficies de Van Der Walls pero no lo suficientemente cercanas para formar puente de hidrógeno. En la figura 32 se observa como el amino de G-57 y K-60 aportan a esta interacción relativamente débil, cabe aclarar que estas interacciones están dadas por los enlaces peptídicos, que aunque no es imposible, este tipo de interacciones con el esqueleto carbonado deben ser facilitadas por otras interacciones más fuertes con cadenas laterales que ayuden al desplazamiento del esqueleto.

Cuando se realizó la minimización de energía de estos modelos los valores fueron considerablemente altos comparados con los valores de la región amino terminal; mientras esta región mostró valores en promedio de -1100 Kcal/mol; la zona II entre las regiones transmembranales, mostró valores de 45 Kcal/mol para glutamato y -180 Kcal/mol para NMDA, lo que indica que la interacción en esta zona es bastante inestable.

El modelo propuesto es que la subunidad NR2B presenta dos zonas extracelulares, una amino terminal, cinco regiones transmembranales y un zona extracelular entre las regiones transmembranales TM4 y TM5. La región amino terminal determina la unión de los ligandos mediante interacciones específicas como puentes de hidrógeno con residuos dadores de protones como la R-519, N-516 y aceptores de protones como S-520, además de algunas interacciones con hidrógenos u oxígenos del esqueleto carbonado, siempre y cuando estén presentes uniones que faciliten el movimiento.

CONCLUSIONES

- Aunque el porcentaje de similaridad de secuencia entre las periplásmicas 2LAO, 1GGG y la subunidad NR2B del receptor NMDA es relativamente baja, del orden de 25 al 30%; las periplásmicas pueden utilizarse como modelo para estudiar el mecanismo de interacción del receptor con el glutamato y NMDA debido a que estas proteínas tienen su estructura resuelta y el tipo de ligando que enlazan son aminoácidos con grupos funcionales comunes, que interactúan mediante mecanismos similares.
- Aunque se encuentran algunos residuos diferentes entre las secuencias de las variantes de la subunidad NR2, las regiones de interés en las zonas extracelulares son significativamente similares y el desarrollo del modelo a partir de NR2B puede ser extrapolado para las demás.
- De las dos regiones homólogas de 1GGG con NR2B solo la región amino terminal presentó un sitio de unión del ligando con interacciones significativas. La unión del glutamato estaría determinada por la estructura y secuencia en la zona amino terminal.
- El mecanismo de interacción ligando – receptor está determinado por interacciones electrostáticas tipo puente de hidrógeno entre los grupos carboxilo y amino del ligando, con las cadenas laterales de los residuos R-519, N515, algunas interacciones de Van Der Waals con S-520. Esto brinda herramientas teóricas importantes para el diseño de antagonistas
- El comportamiento del receptor sensible a NMDA es diferente al comportamiento de los receptores GluR2, donde la subunidad S1S2, formada por dos regiones extracelulares, determina la unión de los ligandos. Este modelo propone la interacción del glutamato y NMDA en una sola región del dominio extracelular, el amino terminal.

- Además de puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de algunos residuos, se presentan interacciones con hidrógenos y oxígenos del esqueleto carbonado estabilizando mucho más la unión del ligando. Esto indica que no solo las cadenas sufren movimientos, sino que el esqueleto carbonado también, puede realizar algunos desplazamientos, siempre que estén fortalecidos por otras interacciones electrostáticas.
- Las modificaciones conformacionales debidas a la interacción ligando – receptor no suceden únicamente a la estructura del receptor, sino también al ligando que debe encontrar la mejor conformación para interactuar con los residuos en el sitio de unión.

SUGERENCIAS

- Realizar la valoración experimental del mecanismo mediante técnicas de mutagénesis sitio dirigida de los residuos de interacción identificados y evaluar la variación en la afinidad del glutamato y/o NMDA, la variación en las corrientes y el tiempo de apertura del canal, y, la influencia en el flujo de iones calcio a través del canal, para finalmente comprender las causas específicas de la apertura del mismo.
- Realizar el alineamiento estructural con diferentes antagonistas para comparar las variaciones en las interacciones. Esto podría permitir hacer mayores análisis sobre los factores determinantes de la apertura del canal.
- Realizar validaciones experimentales con combinaciones quiméricas de las variantes A, C y D de NR2 para encontrar la influencia del tipo de subunidad en el funcionamiento del canal.

BIBLIOGRAFÍA

Abele R., Svergun D., Keinänen K., Koch M., Madden D. 1999. A Molecular Envelope of the ligand-Binding Domain of a Glutamate Receptor in the Presence and Absence of Agonist. *Biochemistry*, Vol 38, No. 34, pp. 10949-10957.

Adams , M., Oxender, D., 1989. Bacterial Periplasmic Binding Protein Tertiary Structures. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.264, No. 27, septiembre 25. pp. 15739 – 15742.

Anson, Lesley C., Chen, P., Wyllie, D., Colquhoun, D., Schoepfer, R. 1998. Identification of Amino Acid Resides of the NR2A subunit that control Glutamate Potency in Recombinant NR1/NR2A. *Journal of Neuroscience*, January 15, 18(2), pp. 581 – 589.

Armstrong N., Gouaux E. 2000. Mechanisms for Activation and Antagonism of an AMPA-sensitive Glutamate Receptor: Crystal Structures of the GluR2 Ligand Binding core. *Neuron*, Vol. 28, pp. 165-181.

Armstrong N., Yu Sun, Guo-Qiang Chen, Gouaux E. 1998. Structure of glutamate - receptor ligand-binding core complex with kainate. *Nature*, Vol 395, No. 29, octubre pp. 913-917.

Bachurin, S., Tkachenko, S., Baskin, I., Madegda, L., 2001. Neuroprotective and cognition-Enhancing Properties of MK-801 Flexible analogs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol 939, pp. 219 – 236.

Blahos, J., Wenthold, R. 1996. Relationship between N-Methyl-D-aspartate Receptor NR1 Splice Variants and NR2 Subunits. *Journal of biological Chemistry*. Vol. 271 No. 26 pp. 15669 – 15674.

Byung-Ha, Jayvardhan Padit, 1993. Three-dimensional Structures of the Periplasmic lysine/Arginine/Ornithine - binding Protein with and without a ligand. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.268, No. 15 : 11348-11355

Byung-Ha, Kang, Ch., De Bondt, H., Kim, S., Kishiko, N., Joshi, A. 1994. The Bacterial Periplasmic Histidine-binding Protein, Structure/function analysis of the ligand-binding site and comparison with related proteins. *Journal of biological chemistry*. Vol 269, No. 6, febrero 11, pp. 4135 – 4143.

Cotman, C., Kahle, J., Miller, S., Ulas, J., Bridges, R., 1995. Excitatory Amino Acid Neurotransmission. *Psychopharmacology: The fourth Generation of progress*, Chapter 7. Ed. Floyd E. Bloom and David J. Kupfer. Raven Press Ltda. New York. Pp. 75 – 85.

Cull-Candy S., Brickley S..2001. NMDA Receptors, *Encyclopedia of life science*, Nature publishing group. www.els.net

Dinglidine, R., Borges, K., Bowie, De., Traynelis, S. 1999. The glutamate Receptors Ion Channels. *Pharmacological Reviews*, Vol.51, No. 1, pp. 7 – 61.

Duran, G., Bennett, M., Zukin, S. 1993. Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein Kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 90 July, pp. 6731 – 6735.

Fayyazuddin, A., Villarroel, A., Le Goff, A., Lerma, J., Neyton, J. 2000. Four residues of the Extracellular N-Terminal Domain of the NR2A subunit Control High-Affinity Zn²⁺ Binding to NMDA Receptors. *Neuron*, Vol. 25, pp.683 – 694.

Guex, N. and Peitsch, M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.

Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, Nov 11;22(22) pp. 4673-4680

Hirokazu H., Kirsch J., Laube B., Betz H., Kuhse J. 1996. The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: Identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol.93:6031-6036.

Ivanovic A., Reilander H., Laubet B., Kuhse J. 1998. Expression and Initial Characterization of a soluble Glycine Binding Domain of the N-Methyl-D-aspartate Receptor NR1 Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, Vol273, No. 32 : 19933-19937.

Jahr, C., Stevens, Ch. 1993. Calcium permeability of the N-methyl-D-aspartate receptor channel in hippocampal neurons in culture. *Neurobiology* , July 21, pp. 11573 – 11577.

Kashiwagi K., Pahk A., Masuki T., Igarashi K., Williams K. 1997. Block and Modulation of N-methyl-D-Aspartate Receptors by Polyamines and Protons: Role of Amino Acid Residues in the Transmembrane and Pore-Forming Regions of NR1 and NR2 subunits. *Molecular Pharmacology*, 52: 701-713.

Katchalski, E., Shariv, I., Eisenstein, M., Asher A., Aftalo, C., Vakser I., 1992. Molecular surface recognition: Determination of geometric fit between proteins and their ligands by correlation techniques. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 89 pp. 2195-2199

Lampinen M., Pentikainen O., Johnson M., Keinänen K. 1998. AMPA receptors and bacterial periplasmic amino acid-binding proteins share the ionic mechanism of ligand recognition. *The EMBO Journal* Vol. 17, No. 16: 4704-4711.

Lesley A., Chen P., Wyllie D., Colquhoun D., Schoepfer R. 1998. Identification of Amino Acid Residues of the NR2A Subunit that Control Glutamate Potency in Recombinant NR1/NR2A. *Journal of Neuroscience*, 18(2) : 581-589.

Mennerick S, Zorumski C. 2001. Glutamate as a Neurotransmitter, *Encyclopedia of life science*, Nature publishing group. www.els.net

Milburn, M., Privé, G., Milligan, D., Scott, W., Yeh, J. 1991. Three-Dimensional Structures of the Ligand-Binding Domain of the Bacterial Aspartate Receptor with and Without a ligand. *Science*, Vol. 254, november 29, pp. 1342 – 1347.

Paas, Y., Devillers, A., Teichberg, V., Changeux, J., Eisenstein, M., 2000. How well can molecular modelling predict the crystal structure: the case of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Elsevier Science, Tips – March*, Vol 21. pp. 87 - 92

Sack J., Sergei D., Trakhanov I., Tsigannik, Florante A., 1989. Structure of the L-Leucine-binding Protein Refined at 2.4 Å Resolution and Comparison with the Leu/Ile/Val-binding Protein Structure. *Journal of Molecular Biology* 206, pp. 193-207.

Schulz, G., Schirmer, R., 1979. *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York. Pp. 27-44, 206-231

Seeburg, P.H. 1993. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16, pp. 359-365 and *Trends Pharmacol. Sci.* 14, pp. 297-303 .

Sharma, G., Stevens, Ch., 1996a. A mutation that alters magnesium block of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Neurobiology* Vol 93, August, pp. 9259 – 9263.

Sharma, G., Stevens, Ch., 1996b. Interactions between two divalent ion binding sites in N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Neurobiology* Vol 93, November, pp. 14170 – 14175.

Stone, A.J., 1996. *The theory of Intermolecular Forces*, Clarendon Press, Oxford, New York. Pp.12-48, 155-183

Sutcliffe, M., Wo, G., Oswald, R. 1996. Three-Dimensional Models of non-NMDA Glutamate Receptors. *Biophysics*, april, Vol 70 No. 4, pp. 1575 – 1589.

Warren, J., Radom, L., Schleyer P., Pople, J., 1986. *Ab initio Molecular Orbital Theory*, John Wiley & Sons, Inc. Canadá. Pp. 10-42, 91-97.

Sun, Y., Rose, J., Wang, B., Hsiao, Ch. 1998. The structure of glutamine-binding Protein complexed with Glutamine at 1,94 Å Resolution: Comparisons with other Amino Acid Binding Proteins. *Journal of Molecular Biology* Vo. 278, pp. 219 – 229.

Watkins JC; Pook PCK; Sunter DC; Davies J; Honoré T. 1990 Experiments with kainate and quisqualate agonists and antagonists in relation to the sub-classification of 'non-NMDA' receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 26, pp.49-55.

Wolf A., Eudean W., Shaw E., Byung-Ha, De Bondt H., Joshi A., Ferro G., 1995. Structure/Funtion Analysis of the Periplasmic Histidine-binding Protein. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 270, No. 27 pp.16097-16106.

Wolf, A., Lee, K., Kirsch, J., Ames, G., 1996. Ligand-dependent Conformational Plasticity of the Periplasmic Histidine-binding Protein HisJ. *Journal of Biological Chemistry*, Vo. 271, No. 35, August 30, pp. 21243 – 21250.

Wood M., VanDongenH., VAnDongen A. 1999. A mutation in the glycine binding pocket of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit alters agonist efficacy. *Molecular Brain Research*, 73 pp. 189-192.

ANEXO 1

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS ENTRE LIGADORA DE GLUTAMINA (1GGG) Y NR2B

lalign output for nr2b vs. ggg

[ISREC-Server] Date: Mon May 13 22:47:58 MET 2002

LALIGN finds the best local alignments between two sequences version 2.0u66 September 1998 Please cite: X. Huang and W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381

Comparison of:

(A) ./wwwtmp/lalign/.9562.1.seq nr2b

- 1482 aa

(B) ./wwwtmp/lalign/.9562.2.seq ggg

- 226 aa

using matrix file: BL50, gap penalties: -14/-4

32.7% identity in 52 aa overlap; score: 109 E(10,000): 0.024

```
          500      510      520      530      540
nr2b  WNGMIGEVMKRAYMAVGLTINEERSEVVDVFSVPFIETGISVMVSRNGTV
      ..... : . : ..... : . : . : . : . : . : . : . : . : . :
ggg   FSGIIPALQTKNVDLALAGITITDERKKAIDFSDGYYSGLLVMMVKANNNDV
      50          60          70          80          90         100
```

25.9% identity in 85 aa overlap; score: 90 E(10,000): 1.2

```
          720      730      740      750      760      770
nr2b  VDDALLSLKTGKLDAAFIYDAAVLNMYMAGRDEGCKLVTIGSGKVFASSTGYGIAIQKDSGWK
      . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :
ggg   IDNAYMELGTNRADAVLHDTPNILYFIKTAGNGQFKAVGDS--LEAQOYGIAFPKGSDDEL
      140          150          160          170          180          190
```

```
          780      790
nr2b  R-QVDLAILQLFGDGEMEELEALWL
      : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :
ggg   RDKVNGALKTLRENGTYNEIYKKWF
      200          210          220
```

47.8% identity in 23 aa overlap; score: 63 E(10,000): 3e+02

```
          270      280
nr2b  LVAGDTPVPSEFPTGLISVSYD
      . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :
ggg   VVATDTAFVPPFEFKQGDLYVGF
      10          20
```

[Back to ISREC bioinformatics group home page](#)

ANEXO 2

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS ENTRE LIGADORA DE LISINA (2LAO) Y NR2B

lalign output for nr2b vs. lao

[ISREC-Server] Date: Mon May 13 22:46:08 MET 2002

LALIGN finds the best local alignments between two sequences version 2.0u66 September 1998 Please cite: X. Huang and W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381

Comparison of:

(A) ./wwwtmp/lalign/.1486.1.seq nr2b

- 1482 aa

(B) ./wwwtmp/lalign/.1486.2.seq lao

- 238 aa

using matrix file: BL50, gap penalties: -14/-4

28.2% identity in 78 aa overlap; score: 72 E(10,000): 51

```
              730              740              750              760              770
nr2b  LKTGKLDAFIYD--AAVLNYM---AGRDEGCKLVTIGSGKVFASTGYGIAIQKD-SGWKR
      : .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:
lao   LTAGRLDAALQDEVAASEGFLKQPAGKEYAFAGPSVKDKKYFGD-GTGVGLRKDDTELKA
      150          160          170          180          190          200

              780              790
nr2b  QVDLAILQLFGDGEMEEL
      : .: .: .: .: .: .:
lao   AFDKALTELKQDGTYDKM
      210          220
```

16.9% identity in 59 aa overlap; score: 57 E(10,000): 1.1e+03

```
          490          500          510          520          530          540
nr2b  INGTWNGMIGEVMKRAYMAVGSLTINEERSEVVDFSVPFIIETGISVMVSRNNGTVSPS
      . . . . .: . . . . .: . . . . .: . . . . .: . . . . .: . . . . .
lao   VASDFDALIPSLKAKKIDAIISLITDKRQOEIAFSDKLYAAD-SRLIAAKGSPIQPT
      50          60          70          80          90          100
```

43.5% identity in 23 aa overlap; score: 48 E(10,000): 5.1e+03

```
          720          730
nr2b  DALL-SLKTGKLDAFIYDAAVLN
      : .: .: .: .: .: .: .
lao   DALIPSLKAKKIDAIISLITD
      60          70
```

[Back to ISREC bioinformatics group home page](#)

ANEXO 3

ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE NR2B DE TRES ESPECIES

View CLUSTALW in: [[MPSA \(Mac, UNIX\)](#) , [About...](#)] [[AnTheProt \(PC\)](#) , [Download...](#)]
[\[HELP\]](#)

UNK-98330 Rattus Norvegicus

UNK-98332 Human

UNK-98331 Mouse

```

          10          20          30          40          50          60
          |           |           |           |           |           |
UNK_98330 MKPSAECCSPKFWLVLAVLAVSGSKARSQKSPPSIGIAVILVGTSDVEAIKDAHEKDDFH
UNK_98332 MKPRAECCSPKFWLVLAVLAVSGSRARSQKSPPSIGIAVILVGTSDVEAIKDAHEKDDFH
UNK_98331 MKPSAECCSPKFWLVLAVLAVSGSKARSQKSAPSIGIAVILVGTSDVEAIKDAHEKDDFH
*** *****:*****.*****
Prim.cons. MKPSAECCSPKFWLVLAVLAVSGSKARSQKSPPSIGIAVILVGTSDVEAIKDAHEKDDFH

          70          80          90          100         110         120
          |           |           |           |           |           |
UNK_98330 HLSVVPVELVAMNETDPKSIITRICDLMsDRKIQGVVFADDDTQEAIQAQILDfISAQTL
UNK_98332 HLSVVPVELVAMNETDPKSIITRICDLMsDRKIQGVVFADDDTQEAIQAQILDfISAQTL
UNK_98331 HLSVVPVELVAMNETDPKSIITRICDLMsDRKIQGVVLADDDTQEAIQAQILDfISAQTL
*****:*****
Prim.cons. HLSVVPVELVAMNETDPKSIITRICDLMsDRKIQGVVFADDDTQEAIQAQILDfISAQTL

          130         140         150         160         170         180
          |           |           |           |           |           |
UNK_98330 TPILGIHGGSSMIMADKDESSMFFQFGPSIEQQASVMLNIMEEYDwyIFsIVTtTYfPGYQ
UNK_98332 TPILGIHGGSSMIMADKDESSMFFQFGPSIEQQASVMLNIMEEYDwyIFsIVTtTYfPGYQ
UNK_98331 TPILGIHGGSSMIMADKDESSMFFQFGPSIEQQASVMLNIMEEYDwyIFsIVTtTYfPGYQ
*****:*****
Prim.cons. TPILGIHGGSSMIMADKDESSMFFQFGPSIEQQASVMLNIMEEYDwyIFsIVTtTYfPGYQ

          190         200         210         220         230         240
          |           |           |           |           |           |
UNK_98330 DfVnKIRSTIENSfVgWELEEVLLLDMSLDDGDSKIQNQLKKLQSPiILLYCTKEEATyI
UNK_98332 DfVnKIRSTIENSfVgWELEEVLLLDMSLDDGDSKIQNQLKKLQSPiILLYCTKEEATyI
UNK_98331 DfVnKIRSTIENSfVgWELEEVLLLDMSLDDGDSKIQNQLKKLQSPiILLYCTKEEATyI
*****:*****
Prim.cons. DfVnKIRSTIENSfVgWELEEVLLLDMSLDDGDSKIQNQLKKLQSPiILLYCTKEEATyI

          250         260         270         280         290         300
          |           |           |           |           |           |
UNK_98330 FEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDtdTVPSEfPTGLISVSYDEWDYGLPARVRDGIaII
UNK_98332 FEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDtdTVPAEfPTGLISVSYDEWDYGLPARVRDGIaII
UNK_98331 FEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDtdTVPSEfPTGLISVSYDEWDYGLPARVRDGIaII
*****:*****
Prim.cons. FEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDtdTVPSEfPTGLISVSYDEWDYGLPARVRDGIaII
```

310 320 330 340 350 360
| | | | | |
UNK_98330 TTAASDMLSEHSFIPEPKSSCYNTHEKRIYQSNMLNRYLINVTFEGRNLSFSSEDGYQMHP
UNK_98332 TTAASDMLSEHSFIPEPKSSCYNTHEKRIYQSNMLNRYLINVTFEGRNLSFSSEDGYQMHP
UNK_98331 TTAASDMLSEHSFIPEPKSSCYNTHEKRIYQSNMLNRYLINVTFEGRNLSFSSEDGYQMHP

Prim.cons. TTAASDMLSEHSFIPEPKSSCYNTHEKRIYQSNMLNRYLINVTFEGRNLSFSSEDGYQMHP

370 380 390 400 410 420
| | | | | |
UNK_98330 KLVIILLNKERKWERVVGKWKDKSLQMKYYVWPRMCPETEEQEDDHLISIVTLEEAPFVIVE
UNK_98332 KLVIILLNKERKWERVVGKWKDKSLQMKYYVWPRMCPETEEQEDDHLISIVTLEEAPFVIVE
UNK_98331 KLVIILLNKERKWERVVGKWKDKSLQMKYYVWPRMCPETEEQEDDHLISIVTLEEAPFVIVE

Prim.cons. KLVIILLNKERKWERVVGKWKDKSLQMKYYVWPRMCPETEEQEDDHLISIVTLEEAPFVIVE

430 440 450 460 470 480
| | | | | |
UNK_98330 SVDPLSGTCMRNTVPCQKRIISENKTDEEPGYIKKCKGFCIDILKKISKSVKFTYDLYL
UNK_98332 SVDPLSGTCMRNTVPCQKRIIVTENKTDEEPGYIKKCKGFCIDILKKISKSVKFTYDLYL
UNK_98331 SVDPLSGTCMRNTVPCQKRIISENKTDEEPGYIKKCKGFCIDILKKISKSVKFTYDLYL
*****:
Prim.cons. SVDPLSGTCMRNTVPCQKRIISENKTDEEPGYIKKCKGFCIDILKKISKSVKFTYDLYL

490 500 510 520 530 540
| | | | | |
UNK_98330 VTNGKHGKKINGTWNMIGEVVMKRAYMAVGS**LTINEER**SEVVDFSVPFIETGISVMVSR
UNK_98332 VTNGKHGKKINGTWNMIGEVVMKRAYMAVGS**LTINEER**SEVVDFSVPFIETGISVMVSR
UNK_98331 VTNGKHGKKINGTWNMIGEVVMKRAYMAVGS**LTINEER**SEVVDFSVPFIETGISVMVSR

Prim.cons. VTNGKHGKKINGTWNMIGEVVMKRAYMAVGS**LTINEER**SEVVDFSVPFIETGISVMVSR

550 560 570 580 590 600
| | | | | |
UNK_98330 SNGTVSPSAFLEPFSADVWMMFVMLLIVSAVAVFVFEYFSPVGYNRCLADGREPGGPSF
UNK_98332 SNGTVSPSAFLEPFSADVWMMFVMLLIVSAVAVFVFEYFSPVGYNRCLADGREPGGPSF
UNK_98331 SNGTVSPSAFLEPFSADVWMMFVMLLIVSAVAVFVFEYFSPVGYNRCLADGREPGGPSF

Prim.cons. SNGTVSPSAFLEPFSADVWMMFVMLLIVSAVAVFVFEYFSPVGYNRCLADGREPGGPSF

610 620 630 640 650 660
| | | | | |
UNK_98330 TIGKAIWLLWGLVFNNSVPVQNPKGTTSKIMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEYV
UNK_98332 TIGKAIWLLWGLVFNNSVPVQNPKGTTSKIMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEYV
UNK_98331 TIGKAIWLLWGLVFNNSVPVQNPKGTTSKIMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEYV

Prim.cons. TIGKAIWLLWGLVFNNSVPVQNPKGTTSKIMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEYV

670 680 690 700 710 720
| | | | | |
UNK_98330 DQVSGLSDKKFQRPNDFSPPFRFGTVPNGSTERNIRNRYAEMHAYMGKFNQRGVDDALLS
UNK_98332 DQVSGLSDKKFQRPNDFSPPFRFGTVPNGSTERNIRNRYAEMHAYMGKFNQRGVDDALLS
UNK_98331 DQVSGLSDKKFQRPNDFSPPFRFGTVPNGSTERNIRNRYAEMHAYMGKFNQRGVDDALLS

Prim.cons. DQVSGLSDKKFQRPNDFSPPFRFGTVPNGSTERNIRNRYAEMHAYMGKFNQRGVDDALLS

730 740 750 760 770 780
| | | | | |
UNK_98330 LKTGKLDAFIYDAAVLNYMAGRDEGCKLVTIGSGKVFASTGYGIAIQKDSGWRQVDLAI
UNK_98332 LKTGKLDAFIYDAAVLNYMAGRDEGCKLVTIGSGKVFASTGYGIAIQKDSGWRQVDLAI
UNK_98331 LKTGKLDAFIYDAAVLNYMAGRDEGCKLVTIGSGKVFASTGYGIAIQKDSGWRQVDLAI

Prim.cons. LKTGKLDAFIYDAAVLNYMAGRDEGCKLVTIGSGKVFASTGYGIAIQKDSGWRQVDLAI

790 800 810 820 830 840
| | | | | |
UNK_98330 LQLFGDGEMEELEALWLTGICHNEKNEVMSSQLDIDNMAGVFYMLGAAMALSLITFICEH
UNK_98332 LQLFGDGEMEELEALWLTGICHNEKNEVMSSQLDIDNMAGVFYMLGAAMALSLITFICEH
UNK_98331 LQLFGDGEMEELEALWLTGICHNEKNEVMSSQLDIDNMAGVFYMLGAAMALSLITFICEH

Prim.cons. LQLFGDGEMEELEALWLTGICHNEKNEVMSSQLDIDNMAGVFYMLGAAMALSLITFICEH

850 860 870 880 890 900
| | | | | |
UNK_98330 LFYWQFRHCFMGVCSGKPGMVFSISRGIYSCIHGVAIEERQSVMNSTATMNNTHSNILR
UNK_98332 LFYWQFRHCFMGVCSGKPGMVFSISRGIYSCIHGVAIEERQSVMNSTATMNNTHSNILR
UNK_98331 LFYWQFRHCFMGVCSGKPGMVFSISRGIYSCIHGVAIEERQSVMNSTATMNNTHSNILR

Prim.cons. LFYWQFRHCFMGVCSGKPGMVFSISRGIYSCIHGVAIEERQSVMNSTATMNNTHSNILR

910 920 930 940 950 960
| | | | | |
UNK_98330 LLRTAKNMANLSGVNGSPQSALDFIRRESSVYDISEHRRSFTHSDCKSYNPPCEENLFS
UNK_98332 LLRTAKNMANLSGVNGSPQSALDFIRRESSVYDISEHRRSFTHSDCKSYNPPCEENLFS
UNK_98331 LLRTAKNMANLSGVNGSPQSALDFIRRESSVYDISEHRRSFTHSDCKSYNPPCEENLFS

Prim.cons. LLRTAKNMANLSGVNGSPQSALDFIRRESSVYDISEHRRSFTHSDCKSYNPPCEENLFS

970 980 990 1000 1010 1020
| | | | | |
UNK_98330 DYISEVERTFGNLQLKDSNVYQDHYHHHRPHSIGSTSSIDGLYDCNPPFTTQPRSISK
UNK_98332 DYISEVERTFGNLQLKDSNVYQDHYHHHRPHSIGSASSIDGLYDCNPPFTTQRSRISK
UNK_98331 DYISEVERTFGNLQLKDSNVYQDHYHHHRPHSIGSTSSIDGLYDCNPPFTTQPRSISK
*****:*****.
Prim.cons. DYISEVERTFGNLQLKDSNVYQDHYHHHRPHSIGSTSSIDGLYDCNPPFTTQPRSISK

1030 1040 1050 1060 1070 1080
| | | | | |
UNK_98330 KPLDIGLPSSKHSQSDLYGKFSFKSDRYSGHDDLIRSDVSDISTHTVTYGNIEGNAAKR
UNK_98332 KPLDIGLPSSKHSQSDLYGKFSFKSDRYSGHDDLIRSDVSDISTHTVTYGNIEGNAAKR
UNK_98331 KPLDIGLPSSKHSQSDLYGKFSFKSDRYSGHDDLIRSDVSDISTHTVTYGNIEGNAAKR

Prim.cons. KPLDIGLPSSKHSQSDLYGKFSFKSDRYSGHDDLIRSDVSDISTHTVTYGNIEGNAAKR

1090 1100 1110 1120 1130 1140
| | | | | |
UNK_98330 RKQQYKDSLKKRPASAKSRREFDEIELAYRRRPPRSPDHKRYFRDKEGLRDFYLDQFRTK
UNK_98332 RKQQYKDSLKKRPASAKSRREFDEIELAYRRRPPRSPDHKRYFRDKEGLRDFYLDQFRTK
UNK_98331 RKQQYKDSLKKRPASAKSRREFDEIELAYRRRPPRSPDHKRYFRDKEGLRDFYLDQFRTK

Prim.cons. RKQQYKDSLKKRPASAKSRREFDEIELAYRRRPPRSPDHKRYFRDKEGLRDFYLDQFRTK

1150 1160 1170 1180 1190 1200

UNK_98330	ENSPHWEHVLDLTDIYKERSDDDFKRDSVSGGGPCTNRSHLKHGTGEEKHGVVGGVPAPWEKN
UNK_98332	ENSPHWEHVLDLTDIYKERSDDDFKRDSISGGGPCTNRSHLKHGTGDKHGVVSGVPAPWEKN
UNK_98331	ENSPHWEHVLDLTDIYKERSDDDFKRDSVSGGGPCTNRSHLKHGTGDKHGVVGGVPAPWEKN *****:*****:*****:*****.*****
Prim.cons.	ENSPHWEHVLDLTDIYKERSDDDFKRDSVSGGGPCTNRSHLKHGTGDKHGVVGGVPAPWEKN
	1210 1220 1230 1240 1250 1260
UNK_98330	LTNVDWEDRSGGNFCRSCPSKLNYSSTVAGQNSGRQACIRCEACKKAGNLYDISKDNSL
UNK_98332	LTNVEWEDRSGGNFCRSCPSKLNYSSTVAGQNSGRQACIRCEACKKAGNLYDISKDNSL
UNK_98331	LTNVDWEDRSGGNFCRSCPSKLNYSSTVAGQNSGRQACIRCEACKKAGNLYDISKDNSL ****:*****:*****:*****:*****
Prim.cons.	LTNVDWEDRSGGNFCRSCPSKLNYSSTVAGQNSGRQACIRCEACKKAGNLYDISKDNSL
	1270 1280 1290 1300 1310 1320
UNK_98330	QELDQPAAPVAVTASNASTTKYPQSPTNSKAQKKNRNKLRRQHSYDTFVLDLQKEEAALAPR
UNK_98332	QELDQPAAPVAVTASNASTTKYPQSPTNSKAQKKNRNKLRRQHSYDTFVLDLQKEEAALAPR
UNK_98331	QELDQPAAPVAVSSNASTTKYPQSPTNSKAQKKNRNKLRRQHSYDTFVLDLQKEEAALAPR *****:*****:*****:*****:*****
Prim.cons.	QELDQPAAPVAVTASNASTTKYPQSPTNSKAQKKNRNKLRRQHSYDTFVLDLQKEEAALAPR
	1330 1340 1350 1360 1370 1380
UNK_98330	SVSLKDKGRFMDGSPYAHMFEMPAGESSEFAN-KSSVPTAG-HHHNNP GSGYMLSKSLYPD
UNK_98332	SVSLKDKGRFMDGSPYAHMFEMPAGESSEFANNKSSVPTAGHHHHNNP GGGYMLSKSLYPD
UNK_98331	SVSLKDKGRFMDGSPYAHMFEMPAGESSEFAN-KSSVPTAG-HHHNNP GSGYMLSKSLYPD *****:*****:*****:*****:*****
Prim.cons.	SVSLKDKGRFMDGSPYAHMFEMPAGESSEFANNKSSVPTAGHHHHNNP GSGYMLSKSLYPD
	1390 1400 1410 1420 1430 1440
UNK_98330	RVTQNPFIPITFGDDQCLLHGSKSYFFRQPTVAGASKTRPDFRALVTNKPVVSALHGAVPG
UNK_98332	RVTQNPFIPITFGDDQCLLHGSKSYFFRQPTVAGASKARPDFRALVTNKPVVSALHGAVPA
UNK_98331	RVTQNPFIPILLGMISACFTAANPTSSGSPRWQGRKQGRTSGLSPISQWCRPFHGAVPG *****:* .. : :. . * * * . * . . :*****.
Prim.cons.	RVTQNPFIPITFGDDQCLLHGSKSYFFRQPTVAGASK3RPDFRALVTNKPVVSALHGAVPG
	1450 1460 1470 1480
UNK_98330	RFQKDICIGNQSNPCVPNNKNPRAFNGSSNGHVYEKLSIESDV
UNK_98332	RFQKDICIGNQSNPCVPNNKNPRAFNGSSNGHVYEKLSIESDV
UNK_98331	RFQKDICIGNQSNPCVPNNKNPRAFNGSSNGHVYEKLSIESDV *****:*****:*****:*****:*****
Prim.cons.	RFQKDICIGNQSNPCVPNNKNPRAFNGSSNGHVYEKLSIESDV

Alignment length : 1484
 Identity (*) : 1418 is 95.55 %
 Strongly similar (:): 21 is 1.42 %
 Weakly similar (.) : 16 is 1.08 %
 Different : 29 is 1.95 %
 Sequence 0001 : UNK_98330 (1482 residues).
 Sequence 0002 : UNK_98332 (1484 residues).
 Sequence 0003 : UNK_98331 (1482 residues).

ANEXO 4

ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE LAS SUBUNIDADES DE NR2

```
Sequence format is Pearson
Sequence 1: gi|2155310|gb|AAB58801.1|      1464 aa      NR2A
Sequence 2: gi|508292|gb|AAA50554.1|     1482 aa      NR2B
Sequence 3: gi|475550|gb|AAA17832.1|     1250 aa      NR2C
Sequence 4: gi|475552|gb|AAA17833.1|     1323 aa      NR2D
Start of Pairwise alignments
Aligning...
Sequences (2:3) Aligned. Score: 41
Sequences (3:4) Aligned. Score: 48
Sequences (1:2) Aligned. Score: 52
Sequences (2:4) Aligned. Score: 37
Sequences (1:3) Aligned. Score: 42
Sequences (1:4) Aligned. Score: 37
Guide tree      file created:  [/net/nfs0/vol1/production/w3nobody/tmp/506784.149821-231089.dnd]
Start of Multiple Alignment
There are 3 groups
Aligning...
Group 1: Sequences:  2      Score:19749
Group 2: Sequences:  2      Score:23947
Group 3: Sequences:  4      Score:17974
Alignment Score 19710
CLUSTAL-Alignment file created  [/net/nfs0/vol1/production/w3nobody/tmp/506784.149821-231089.aln]
```

Your Multiple Sequence Alignment:

[506784.149821-231089.aln](#)

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```
gi|475550|gb|AAA17832.1|      MPALVSLQDPPVDMGGALGPALLLTS-----LLGAWARLGAGQGEQAVTV 45
gi|475552|gb|AAA17833.1|      MRGAGGPRGPRGPAKMLLLLALACVSPFPPEEVPGPVAVGGGTGGARQLNV 50
gi|2155310|gb|AAB58801.1|      -----MGRLGYWTLVLVLPALLVWR-----DPAQNAAAEEKGPPALNI 36
```

gi 508292 gb AAA50554.1	-----MKPSAECCSPKFWLVLA-----VSGSKARSQKSPPSIGI	37
	. . *	: :
gi 475550 gb AAA17832.1	AVVFGSSGPLQTQARTRLTSQNFLDLP-LEIQPLTVGVNNTNPSSILTQI	94
gi 475552 gb AAA17833.1	ALVFSGPAYAAEAARLGPAAVAVRSPGLDVRPVALVNLGSDPRSLVLQL	100
gi 2155310 gb AAB58801.1	AVLLGHSVDVTERELRNLDWPEQATGLPLDVNVVALLMNRTDPKSLITHV	86
gi 508292 gb AAA50554.1	AVILVGTSD--EVAIKDAHEKDDFHHLVSVVPRVELVAMNETDPKSIITRI	85
	*::: .	: . : * : * * : : :
gi 475550 gb AAA17832.1	CGLLGAARVHGIVFEDNVDTEAVAQLLDFVSSQTHVPILSISGGSAVVL	144
gi 475552 gb AAA17833.1	CDLLSGLRVHGVVFEEDSRAPAVAPILDFLSAQTSLPVAVHGGAAALVLT	150
gi 2155310 gb AAB58801.1	CDLMSGARIHGLVFGDDTDQEAVAQMLDFISSQTFIPILGIHGGASMIMA	136
gi 508292 gb AAA50554.1	CDLMSDRKIQGVVFADDTDQEAIQILDFISAQTLTPILGIHGGSSMIMA	135
	*. * . : : : * * * * : * * : * * * * * * : : * * * * * : :	
gi 475550 gb AAA17832.1	PKEPGSAFLQLGVSLEQQQLQVLFKVLLEEYDWSAFAVITSLHPGHALFLEG	194
gi 475552 gb AAA17833.1	PKEKGSTFLQLGSSTEQQQLQVIFEVLEEYDWTSTFVAVTTRAPGHRFLSY	200
gi 2155310 gb AAB58801.1	DKDPTSTFFQFGASIQQATVMLKIMQDYDWHVFSLVTTIFPGYRDFISF	186
gi 508292 gb AAA50554.1	DKDESSMFFQFGPSIEQQASVMLNIMEEYDWHYIFSIVTTYFPGYQDFVNK	185
	* : * * : * * * : * * * : : : * * * * * * * * * : * : * * : * : .	
gi 475550 gb AAA17832.1	VRAVADASYLSWRLLDVLTLLELPGGPRARTQRLLRQVDAPVLVAYCSRE	244
gi 475552 gb AAA17833.1	IEVLTDGSLVGEHREGALTLDPGAG--EAVLGAQLRSVSAQIRLLFCARE	248
gi 2155310 gb AAB58801.1	IKTTVDNSFVGVDMQNVITLDTSFED--AKTQVQLKKIHSSVILLYCSKD	234
gi 508292 gb AAA50554.1	IRSTIENSFVGELEEVLLDMSLDDGDSKIQNQLKQLQSPIILLYCTKE	235
	: . : * : . * . : * : . : * : : : : : : * : : :	
gi 475550 gb AAA17832.1	EAEVLFAAEAQAGLVGPGHVWLVP--NLALGSTDAPP-----AAFP	283
gi 475552 gb AAA17833.1	EAEPVFRAAEEAGLTGPGYVWFVMPQLAGGGGSGVPGEPPLLPGGSPLP	298
gi 2155310 gb AAB58801.1	EAVLILSEARSLGLTGYDFFWIVP--SLVSGNTELIP-----KEFP	273
gi 508292 gb AAA50554.1	EATYIFEVANSVGLTGYGYTWIVP--SLVAGDTDVTP-----SEFP	274
	** : : * . ** . * . . * : : . * . * . . * : : * : *	
gi 475550 gb AAA17832.1	VGLISVVTESWRLSLRQKVRDGVAILALGAHSYRRQYGTLPAPAGDCRRH	333
gi 475552 gb AAA17833.1	AGLFAVRSAWRDDLARRVAAGVAVVARGAQALLRDYGFLELGHDCRTQ	348
gi 2155310 gb AAB58801.1	SGLISVSYDDWDYSLEARVRDGLGILTTAASSMLEKFSYIPEAKASCYGQ	323
gi 508292 gb AAA50554.1	TGLISVSYDEWDYGLPARVRDGLAIIITTAASDMLSEHSFIPEPKSSCYNT	324
	* : : * * . * : * * : : : . * . . . : * . *	

gi 2155310 gb AAB58801.1	PKGTTSKIMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEFVDQVTGLSDKKFQ	671
gi 508292 gb AAA50554.1	PKGTTSKIMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEYVDQVSGLSDDKKFQ	672
	*:***** *****:.* *:****:***	
gi 475550 gb AAA17832.1	RPQDQYPPFRFGTVPNGSTERNIRSNYRDMHMHVKNQRSVEDAL/TSLK	732
gi 475552 gb AAA17833.1	RPQEQYPPPLKFGTVPNGSTEKNIRSNYPDMHSYVRYNQPRVEEAL/QLK	746
gi 2155310 gb AAB58801.1	RPHDYSPPFRFGTVPNGSTERNIRNNYPYMHQYMTFRFNQRGVEDALVSLK	721
gi 508292 gb AAA50554.1	RPNDFSPPFRFGTVPNGSTERNIRNNYAEMHAYMGKFNQRGVDDALLSLK	722
	:: **::***:***.* ** :* :.* **::** .**	
gi 475550 gb AAA17832.1	MGKLDAFIYDAAVLNYMAGKDEGCKLVTIGSGKVFATTGYGIAMQKDSHW	782
gi 475552 gb AAA17833.1	AGKLDAFIYDAAVLNYMARKDEGCKLVTIGSGKVFATTGYGIALHKGSRW	796
gi 2155310 gb AAB58801.1	TGKLDAFIYDAAVLNYKAGRDEGCKLVTIGSGYIFATTGYGIALQKGS PW	771
gi 508292 gb AAA50554.1	TGKLDAFIYDAAVLNYMAGRDEGCKLVTIGSGKVFAS TGYGIAIQKDSGW	772
	***** * :***** :**:* **::** .**	
gi 475550 gb AAA17832.1	KRAIDLALLQLLGDGETQKLETVWLSGICQNEKNEVMSSKLDIDNMAGVF	832
gi 475552 gb AAA17833.1	KRPIDLALLQFLGDDEIEMLERLWLSGICHNDKIEVMSSKLDIDNMAGVF	846
gi 2155310 gb AAB58801.1	KRQIDLALLQFVGDGEMEELETLWLTGICHNEKNEVMSSQLDIDNMAGVF	821
gi 508292 gb AAA50554.1	KRQVDLAILQLFGDGEMEELEALWLTGICHNEKNEVMSSQLDIDNMAGVF	822
	** :***:*.**.* : ** :***:***:.* *****:*****	
gi 475550 gb AAA17832.1	YMLLVAMGLALLVFAWEHLVYWKLRHSVP--NSSQLDFLLAFSRGIYSCF	880
gi 475552 gb AAA17833.1	YMLLVAMGLSLLVFAWEHLVYWRLLRHCLG--PTHRMDFLAFSRGMYS CC	894
gi 2155310 gb AAB58801.1	YMLAAAMALSLITFIWEHLFYWKLRFCFTGVCSDRPGLLFSISRGIYSCI	871
gi 508292 gb AAA50554.1	YMLGAAMALSLITFICEHLFYWQFRHCFMGVCSGKPGMVFSISRGIYSCI	872
	*** .**.*:*.**.* **.***:*... : : .:****:***	
gi 475550 gb AAA17832.1	NGVQSLPSP---ARPP-----SPDLTADSAQA-----	904
gi 475552 gb AAA17833.1	S-AEAAPPP---AKPPPPQPLPSPAYPAARPPP-----	924
gi 2155310 gb AAB58801.1	HGVHIEEKK---KSPDFNL TGSQSNMLKLLRS AKNINSNMNMN SSRMDSP	918
gi 508292 gb AAA50554.1	HGVAIEERQSVMN SPTATMNNTHSNILRLLRTAKNMANLSGVNGS---P	918
	. * *	
gi 475550 gb AAA17832.1	-NVLKMLQAARDMVN-----TADVSSSLDR	928
gi 475552 gb AAA17833.1	-GPAPFVPRERAAADRWRRAKGTGPPG-----GAAIADGFHR	960
gi 2155310 gb AAB58801.1	KRATDFIQRGLIVDMVSDKGNLIYSDNRSFQG--KDSIFGDNMNELQT	965
gi 508292 gb AAA50554.1	QSALDFIRRESSVYDISEHRRSFTHSDCKSYNNPPCEENLFSYDISEVER	968
	:: :	

gi 475550 gb AAA17832.1	ATRTIEN-----WGNRRVPAPTAS-----GPRSS	953
gi 475552 gb AAA17833.1	YYGPIEQQLG-----LGDARAAPRGAAG-----RPLSP	989
gi 2155310 gb AAB58801.1	FVANRHKDNL SNYVFQGHPLTLNDSNPNTVEVAVSTESKGNRPRQLWK	1015
gi 508292 gb AAA50554.1	TFGNLQLKDSN--VYQDHY--HHHHRPHSIGSTSSIDGLYDCD-NPPFT	1012
	. . . :	
gi 475550 gb AAA17832.1	-TPGPPGQPSPSGWGPPGGGR--TPLARRAPQPPARPAT-CGPPLPDVSR	999
gi 475552 gb AAA17833.1	PTTQPPQKPPPSYFAIVREQEPTPEPPAGAFPGFSPAP-AAAAAAVGP	1038
gi 2155310 gb AAB58801.1	KSMESLRQDSL NQ-NPVSQRDEKTAENRTHSLKSPRYLP-EEVAHSDISE	1063
gi 508292 gb AAA50554.1	TQPRSISKKPLDIGLPSSKHSQSLDLYGKFSFKSDRYSGHDDLIRSDVSD	1062
	. : :	
gi 475550 gb AAA17832.1	PSCRHASDARWPVRVGHQGPVHSASERRALPERSLLPAHCHYSSFP--RA	1047
gi 475552 gb AAA17833.1	PLCRLAFEDESP-APSRWPRSDPESQPLLGGGAGGPSAGAPTAPPPRA	1087
gi 2155310 gb AAB58801.1	TSSRATCHREPDNNKNHKTKNDFKRSMAS-----KYPKDCSDVDRTYMKT	1108
gi 508292 gb AAA50554.1	ISTHTVTYGNIEGNAAKRRKQYKDSLKRPASAKSRREFDEIELAYRRR	1112
	: :	
gi 475550 gb AAA17832.1	ERSGRPYLPLFPEPPEPDDLALLGPEQLARREAMLRAAWAR-----	1088
gi 475552 gb AAA17833.1	APPPCAYLDLEPSPDSESESLGGASLGGLEPWWFADFPYPAERL---	1134
gi 2155310 gb AAB58801.1	KASSPRDKIYITIDGEKEPSFHLDPPQFVENITL PENVGFPTYQDHNENF	1158
gi 508292 gb AAA50554.1	PPRSPDHKRYFRDKEGLRDFYLDQFRTKENS PHWEHVLDLTDIYKERSDDF	1162
	
gi 475550 gb AAA17832.1	-----GPRP-RHASLPSSVAEAFTRSNPLPA	1113
gi 475552 gb AAA17833.1	-----GPPPGRYWSVDKLGGRAGSWDYLP	1160
gi 2155310 gb AAB58801.1	RKGDSTLPMNRNPLHNEDGLPN--NDQYKLYAKHF' TLKDKGSPHSEGS DR	1206
gi 508292 gb AAA50554.1	KRDSVS---GGGCTNRSHLKHGTGEKHGVVGGVPAPWEKNLTNVDWEDR	1209
	. :	
gi 475550 gb AAA17832.1	R--CTGHACACPCPQSRPS-----CRHLAQA	1137
gi 475552 gb AAA17833.1	RGGPAWHCRHCASLELLPP-----PRHLSCS	1186
gi 2155310 gb AAB58801.1	YRQNSTHCRSCLSNLPTYSGHFTMRSP-----FKCDA CLR MG NLYDIDED	1251
gi 508292 gb AAA50554.1	SGGN--FCRSCPSKLHNYSSSTVAGQNSGRQACIRCEACKAGNLYDISK D	1257
	. . * . . :	
gi 475550 gb AAA17832.1	QSLRLPSYPEACVEGVPAGVA-----TWQPRQHVCLHAHTRLPF	1176
gi 475552 gb AAA17833.1	HDGLDGGWWAPPPPPWAAGPP-----PRRRARC GC PRPHPRPR	1225

```

gi | 2155310 | gb | AAB58801.1 | QMLQETGNPATREEVYQQDWS-----QNNALQFQKNKLRINRQHSYDNI 1295
gi | 508292 | gb | AAA50554.1 | NSLQELDQPAAPVAVTSNASSTKYPQSPTNSKAQKKNRNKLRQHSYDTF 1307
: . . . : : : *

gi | 475550 | gb | AAA17832.1 | CWGTVCRHPPPCTSHSPWLIG-TWEPPAHRVRTLGLGTGYRDSGVLEEV 1225
gi | 475552 | gb | AAA17833.1 | ASHRAPAAAPHHRHRAAGGWDFPPPPTSRSLLEDLSSCTTAAPTRRLT 1275
gi | 2155310 | gb | AAB58801.1 | LDKPREIDLRSRPSRSISLKDRERLLEGNLYGSLFVSPSSK-LLGNKSSLF 1344
gi | 508292 | gb | AAA50554.1 | VDLQKEEAALAP-RSVSLKDKGRFMDGSPYAHMFEMPAGESSEFANKSSVP 1356
: : . . :

gi | 475550 | gb | AAA17832.1 | RE-----TCGTQGFPRCTWR----- 1241
gi | 475552 | gb | AAA17833.1 | GP-----SRHARRCPHAAHWGPPLPTASHRRHRG--- 1304
gi | 2155310 | gb | AAB58801.1 | PQGLEDSKR-----SKSLLPDHASNPFLLHTYGGDDQRLVIGRCPSDPYK 1388
gi | 508292 | gb | AAA50554.1 | TAGHHHNNPGSGYMLSKSLYPDRVTQNPFIPTFGDDQCLLHGSKSYFFRQ 1406
. . * :

gi | 475550 | gb | AAA17832.1 | -----
gi | 475552 | gb | AAA17833.1 | -----
gi | 2155310 | gb | AAB58801.1 | HSLPSQAVNDSYLRSRLR---STASYCSRDSRGHSDVYI SEHVMPYAAN 1434
gi | 508292 | gb | AAA50554.1 | PTVAGASKTRPDFRALVTNKPVVSALHGAVPGRFQKDICIGNQSNPCV 1456

gi | 475550 | gb | AAA17832.1 | -----RVSSLESEV 1250
gi | 475552 | gb | AAA17833.1 | -----GDLGTRRGS AHFSSLESEV 1323
gi | 2155310 | gb | AAB58801.1 | KNTMYSTPRVNLNSCSNRRVYKKMPSIESDV 1464
gi | 508292 | gb | AAA50554.1 | N----KNPRAFNGSSNGHVYEKLSIESDV 1482
: . . * : * : *

```

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRIA EN BIOLOGIA

LUZ MIREYA CORTES URQUIJO

**MODELO DE LA ESTRUCTURA Y DEL
MECANISMO DE INTERACCION CON
EL GLUTAMATO Y EL NMDA PARA EL
RECEPTOR IONOTROPICO DE
GLUTAMATO SENSIBLE A N-Metil-D-
Aspartato**

INTRODUCCION

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar el modelo del mecanismo y la estructura del sitio de interacción de la subunidad NR2B del receptor ionotrópico de glutamato sensible a N-Metil-D-aspartato (NMDA) con glutamato y NMDA, a partir de la homología con las proteínas periplásmicas bacterianas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar los residuos de amino ácidos presentes en los sitios de interacción de la subunidad S1S2 del receptor de glutamato iGluR2 y las proteínas periplásmicas bacterianas.
- Encontrar regiones de homología entre las secuencias de la subunidad NR2B y las periplásmicas a partir de alineamientos de secuencia.

INTRODUCCION

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Diseñar, por mutaciones puntuales con el programa spdviewer, la región de interacción con glutamato, a partir de las zonas homólogas con las periplasmicas.
- Analizar el mecanismo de interacción del glutamato y NMDA con la región diseñada, a partir del “docking” de las estructuras con el programa Gramm.
- Generar un modelo predictivo para las interacciones con glutamato y NMDA.

MARCO CONCEPTUAL

SISTEMA NERVIOSO

CELULAS

NEUROTRANSMISOR

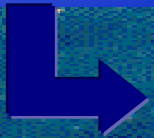
GLUTAMATO

SINAPSIS QUIMICA

RECEPTORES

FLUJO DE IONES

DIFERENCIA DE POTENCIAL



IONOTROPICOS

METABOTROPICOS

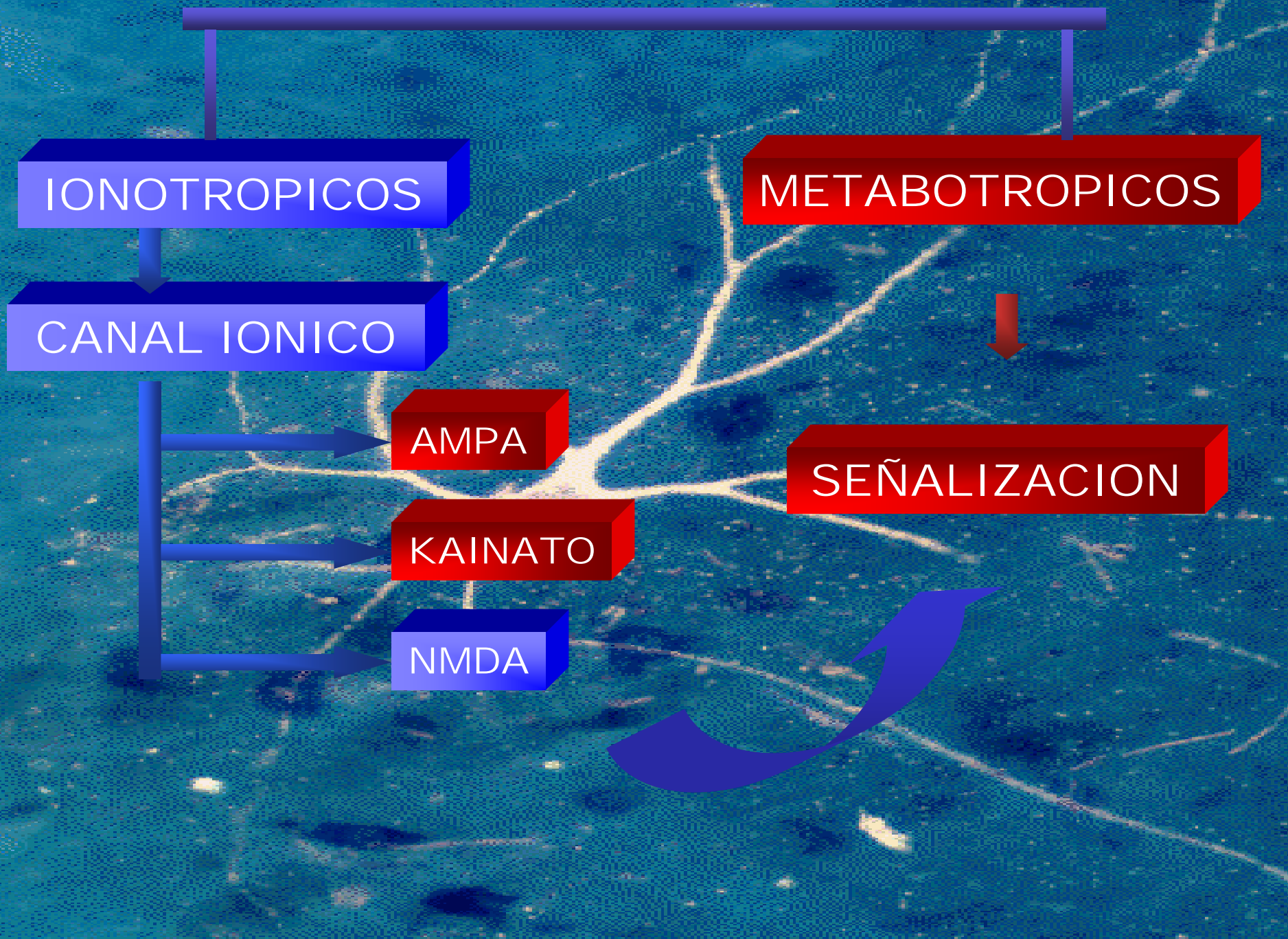
CANAL IONICO

AMPA

KAINATO

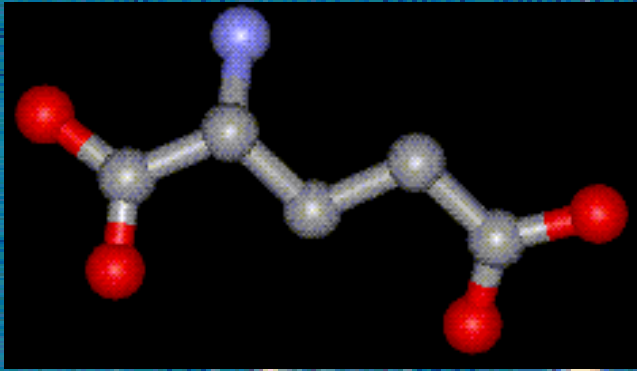
NMDA

SEÑALIZACION

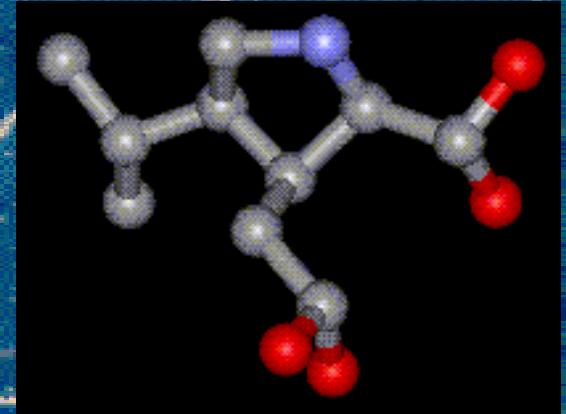


LOS LIGANDOS

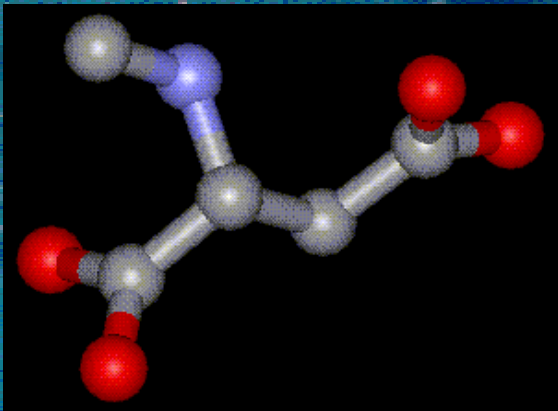
GLUTAMATO



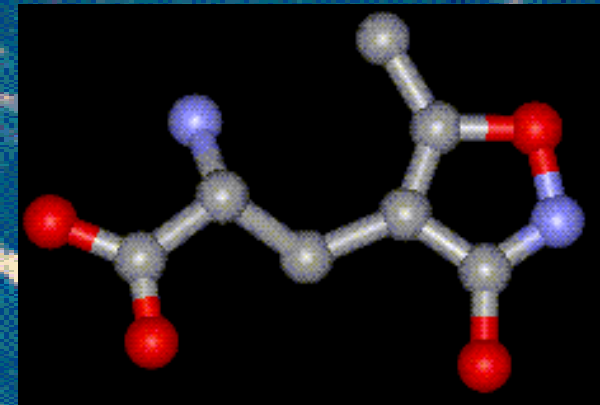
KAINATO



NMDA



AMPA

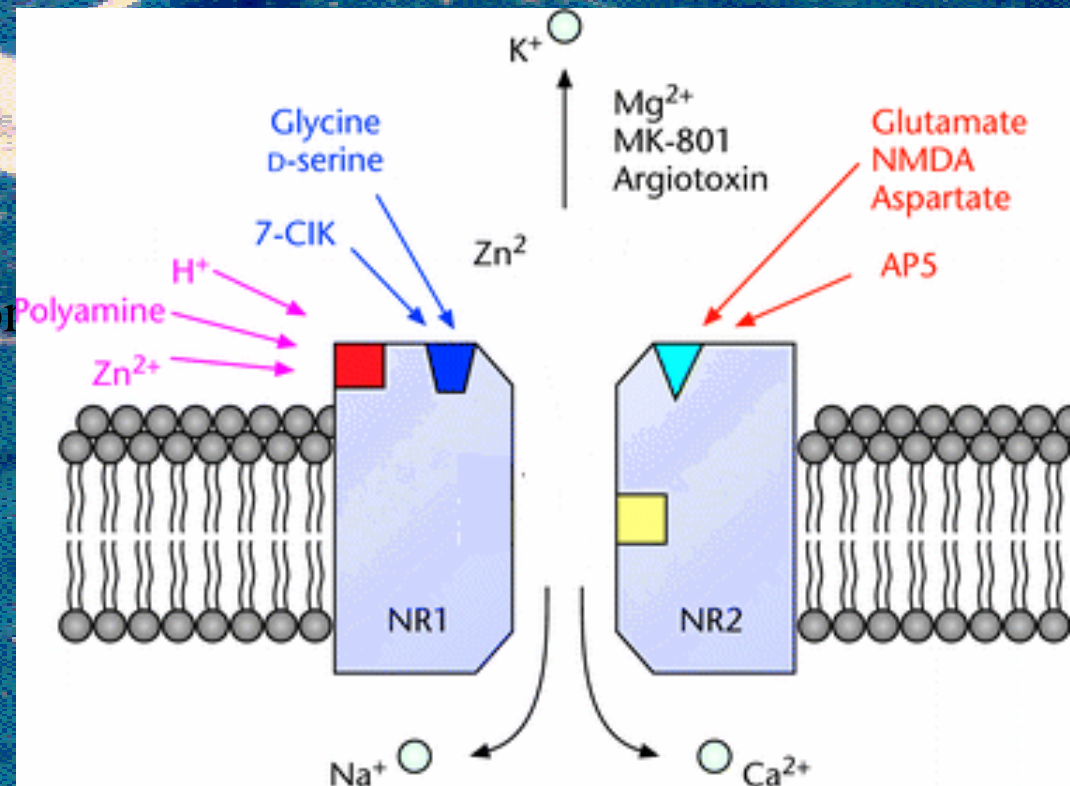


FAMILIA DE RECEPTORES

Familia de Receptores	Subunidades	Genes
AMPA	GluR1	GRIA1
AMPA	GluR2	GRIA2
AMPA	GluR3	GRIA3
AMPA	GluR4	GRIA4
Kainato	GluR5	GRIK1
Kainato	GluR6	GRIK2
Kainato	GluR7	GRIK3
Kainato	KA-1	GRIK4
Kainato	KA-2	GRIK5
NMDA	NR1	GRIN1
NMDA	NR2A	GRIN2A
NMDA	NR2B	GRIN2B
NMDA	NR2C	GRIN2C
NMDA	NR2D	GRIN2D
NMDA	NR3A	GRIN3A
NMDA	NR3B	GRIN3B

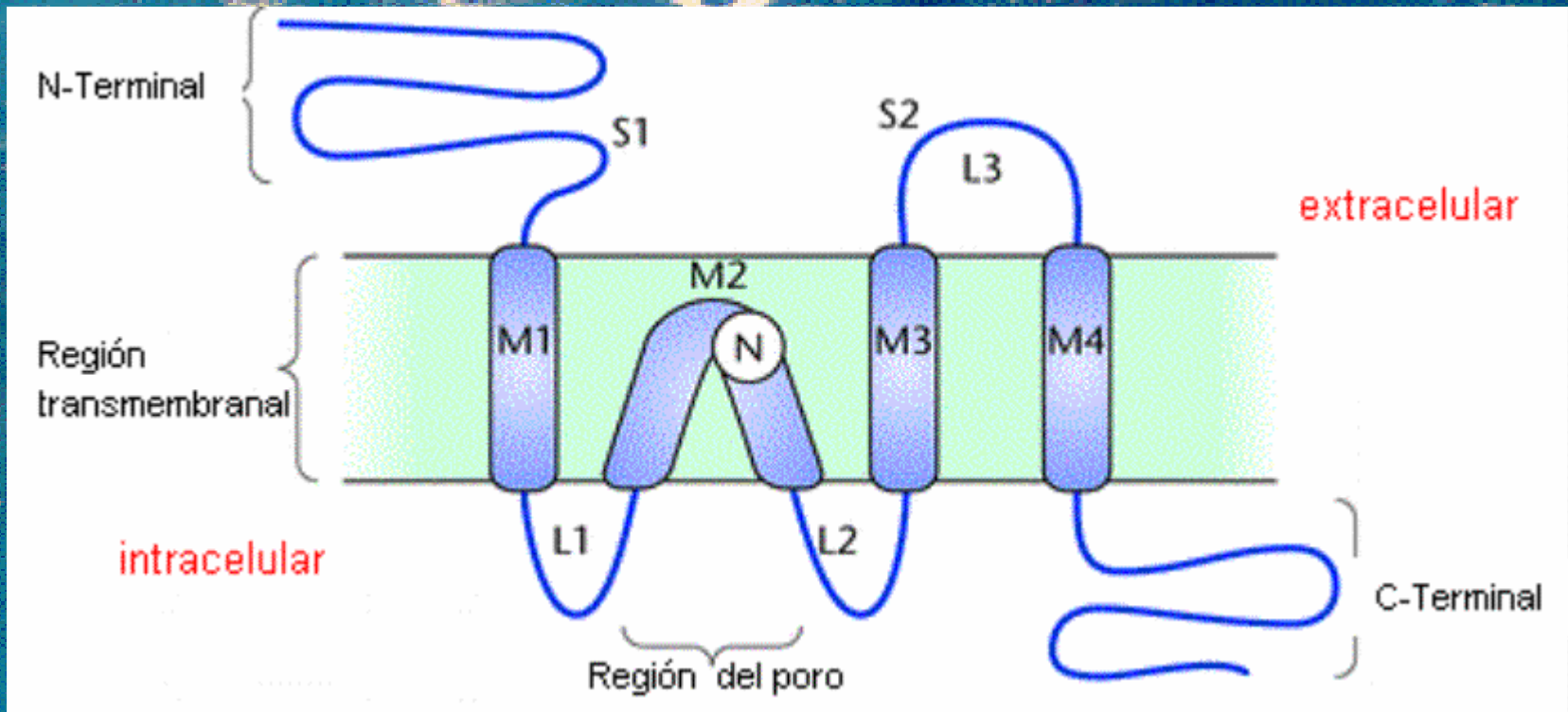
RECEPTOR SENSIBLE A N-Metil-D- aspartato (NMDA)

- Organización multimérica
- Permeabilidad a catión calcio.
- Requiere coagonistas.
- Bloqueo por iones Zn , Mg y por protones
- Antagonista
- Interacción con poliaminas, inhibición y potenciación.
- Plasticidad sináptica, potenciación a largo plazo
- Patologías severa, memoria y aprendizaje
- NR1 altamente expresada y NR2 variable

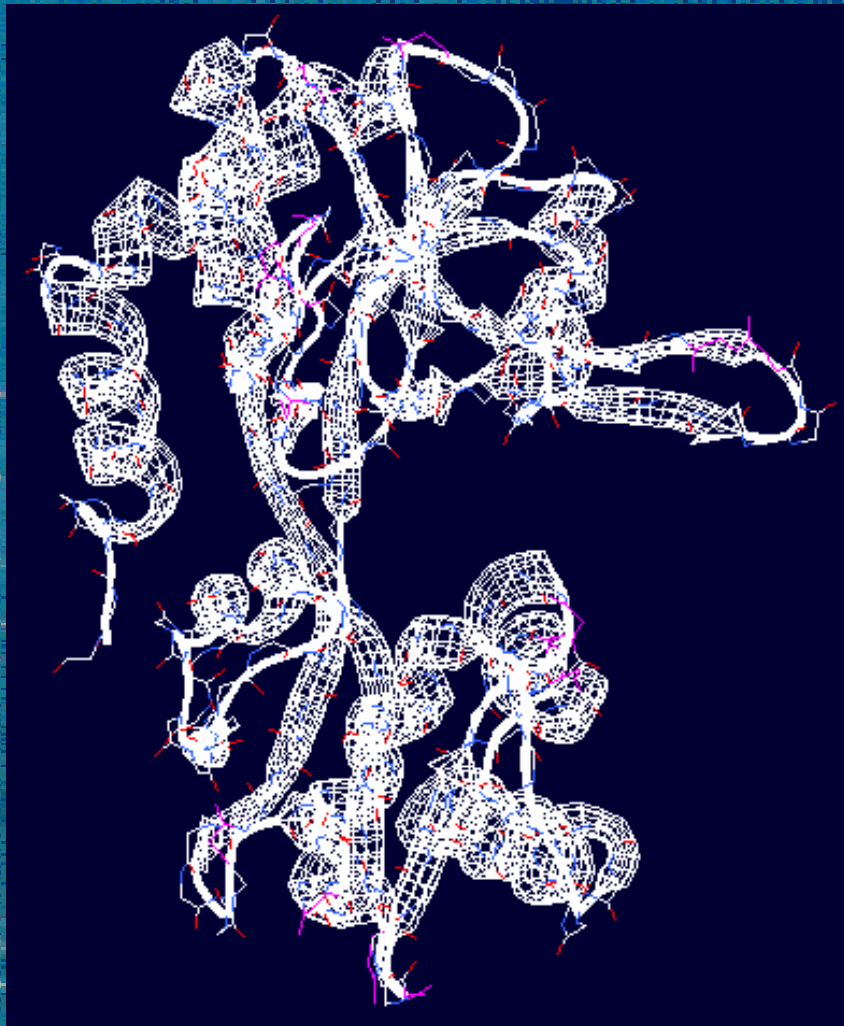


RECEPTORES NO NMDA

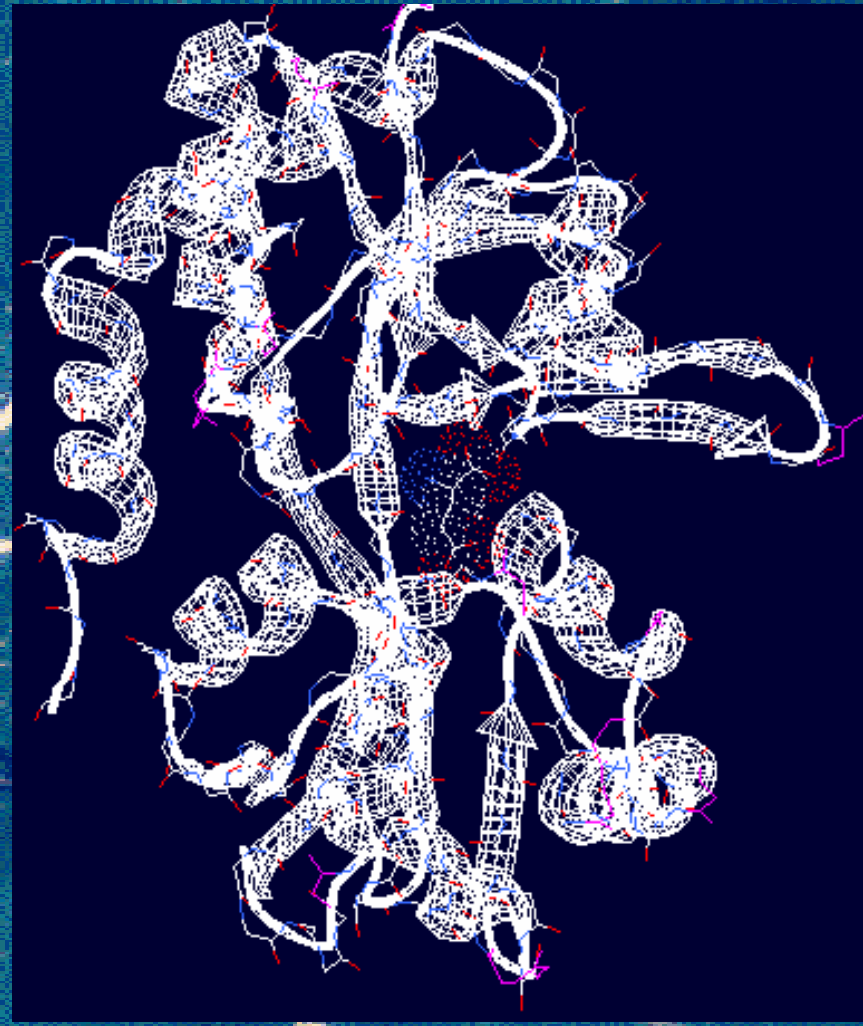
- Organización multimérica: AMPA (GluR1,2,3,4) KA (GluR5,6,7, Ka-1, Ka-2).
- Dominio extracelular S2S2, sitio de unión de glutamato y agonistas.
- Receptor quimérico GluR4 y GluR2, estructura con kainato, AMPA, glutamato y antagonista DNQX.



ESTRUCTURA DE SUBUNIDAD S1S2



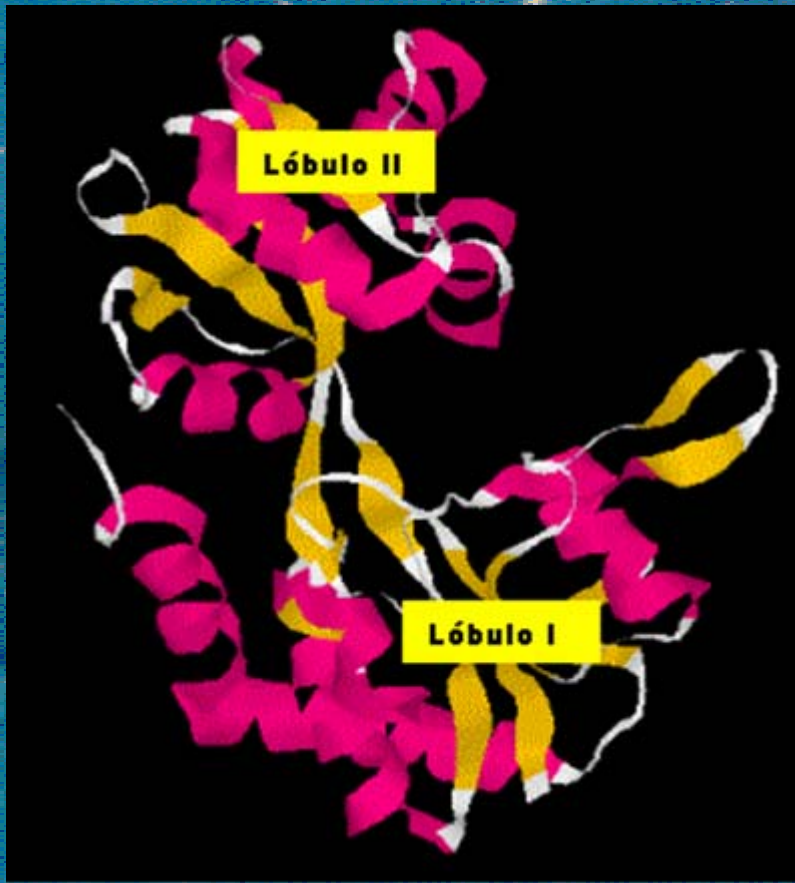
FORMA APO



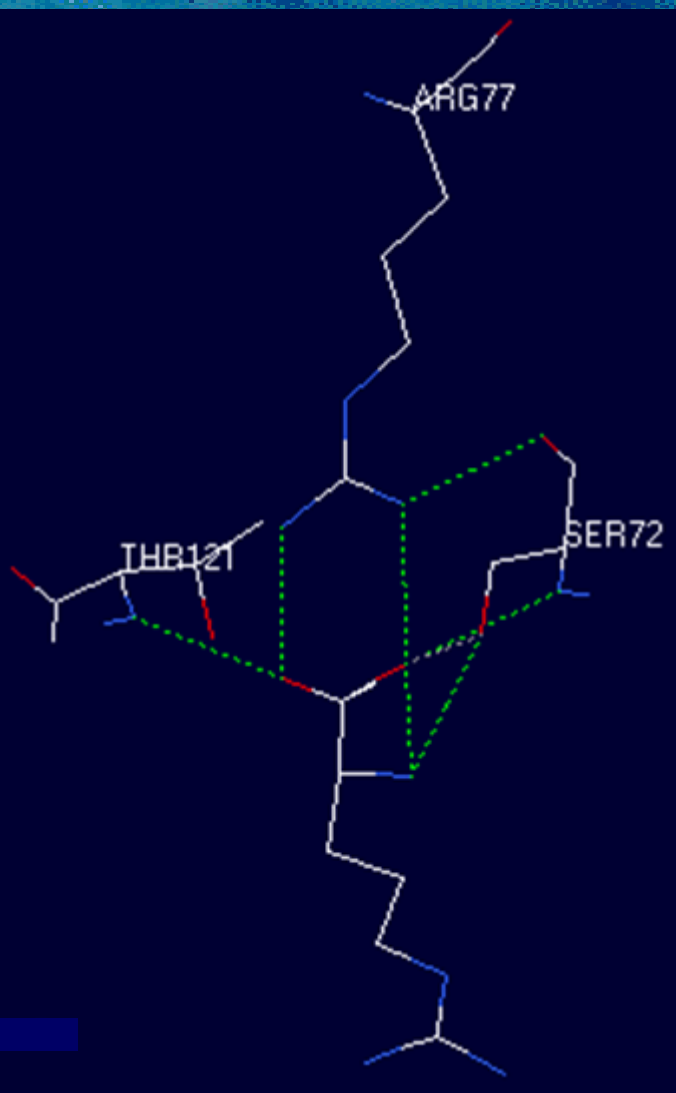
FORMA LIGADA

PROTEINAS PERIPLASMICAS BACTERIANAS

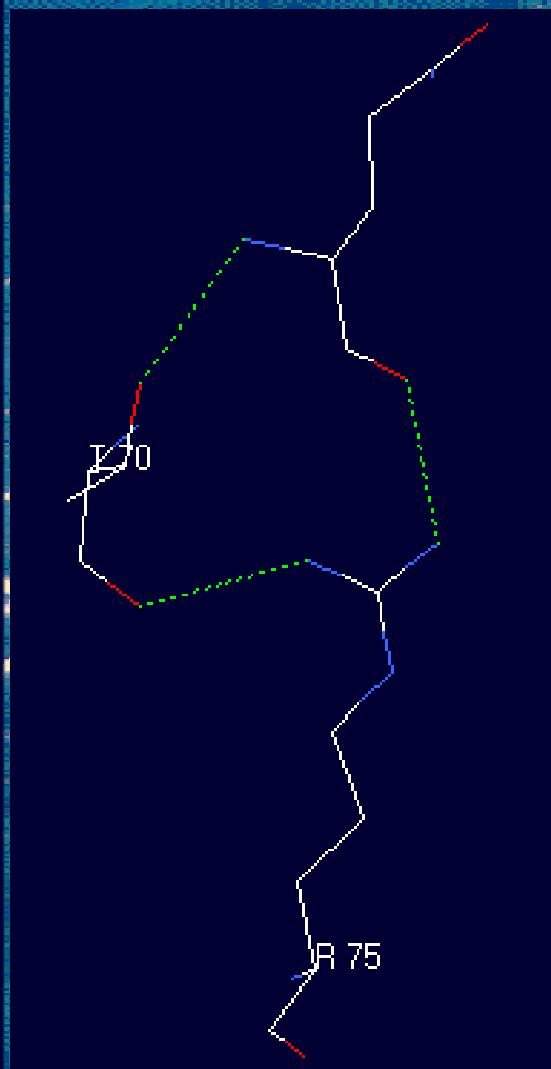
- Sistema de transporte de amino ácidos, carbohidratos, oligosacaridos, vitaminas.
- Estructura basada en dos lóbulos que se cierran en la unión del ligando.
- LAOBP (2LAO) , QBP (1GGG)



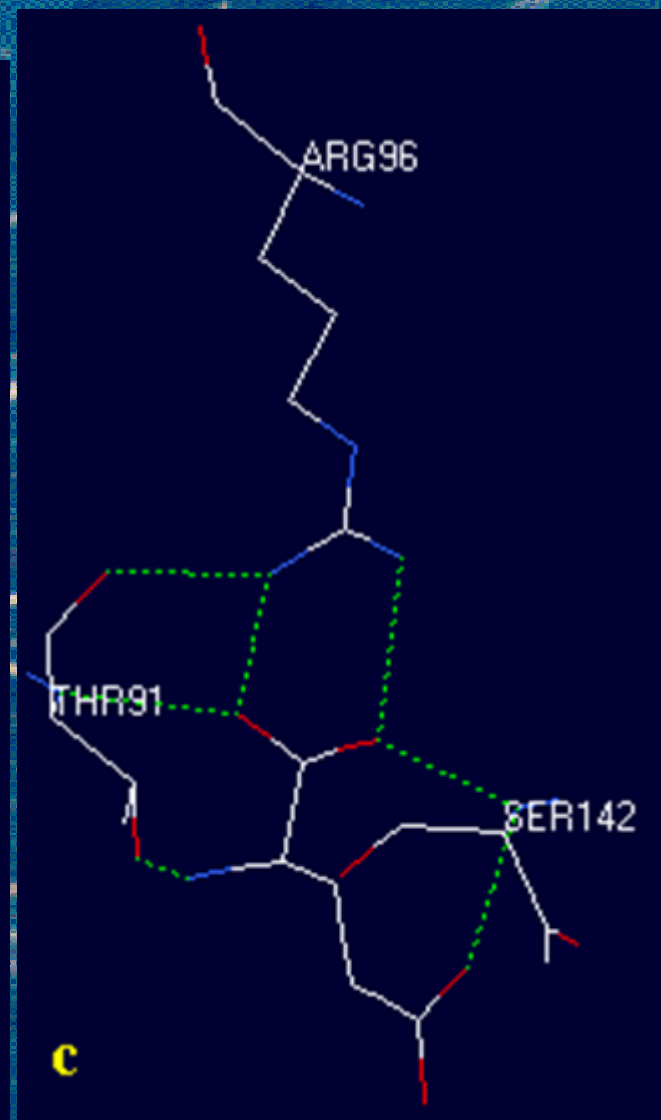
INTERACCIONES LIGANDO - RECEPTOR



R - 1laf

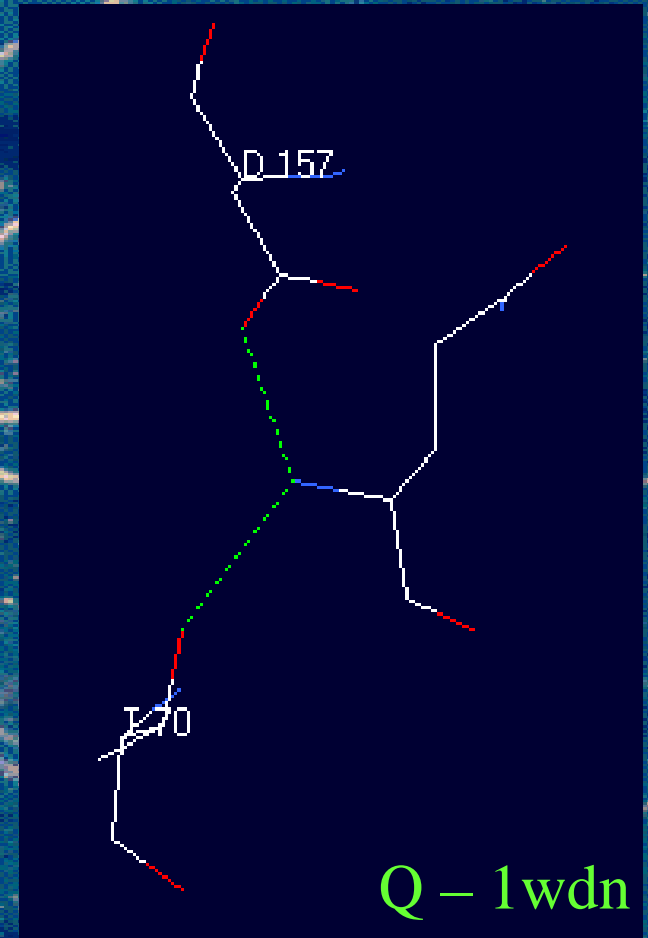
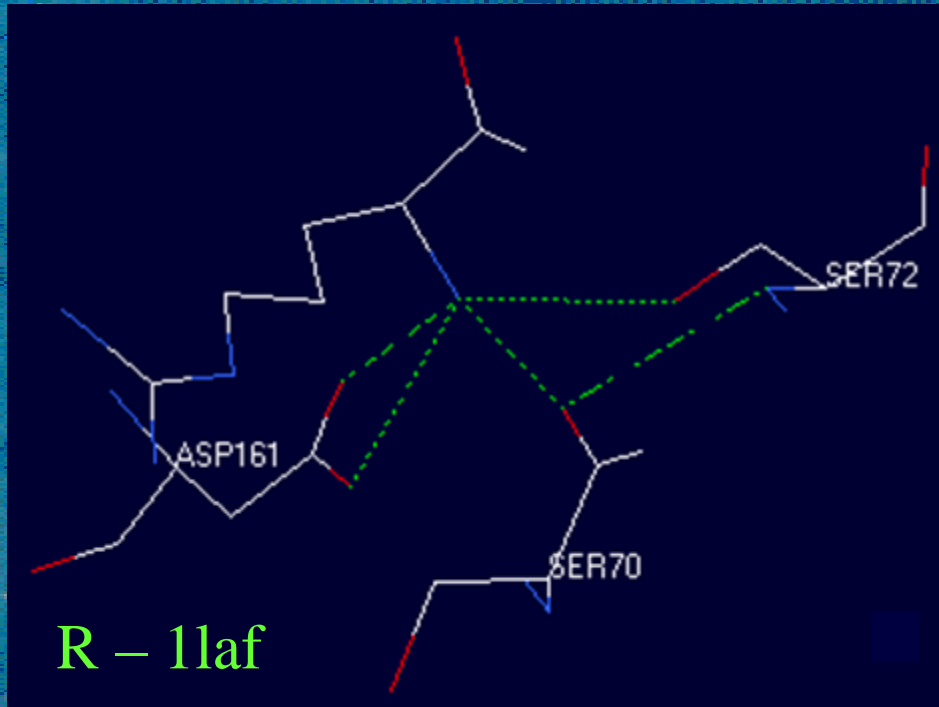


Q - 1wdn

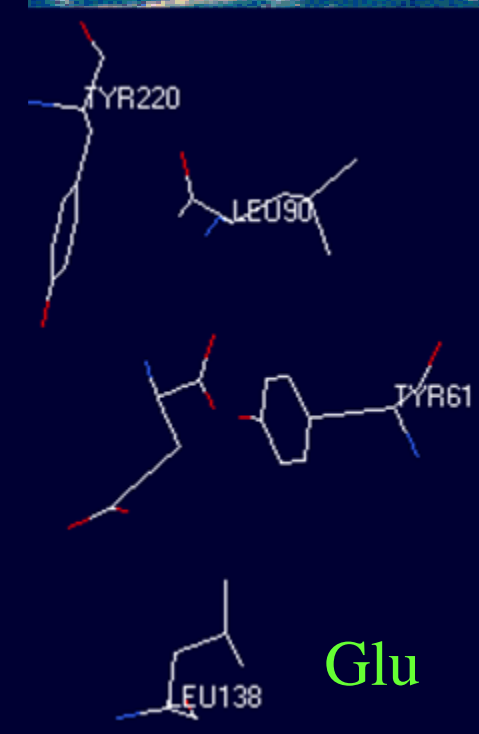


E- 1ftj

INTERACCIONES LIGANDO - RECEPTOR



INTERACCIONES LIGANDO - RECEPTOR



Residuos de interaccion en proteínas periplasmicas y en GluR2

1WDN(Gln)	1VLT (Asp)	1HSL(Hys)	1LST(Lys)	1LAF(Arg)	1LAG(Hys)	1LAH(Orn)	iGluR2
D10	R64	D11	D11	D11	D11	D11	E13
P13	S68	Y14	Y14	Y14	Y14	Y14	Y61
P50	Y149	L52	P52	P52	P52	P52	P89
A67	P150	S69	S69	S69	S69	S69	T91
G68	A151	S70	S70	S70	S70	S70	R96
T70	Q152	L71	L71	L71	L71	L71	L138
R75	T154	S72	S72	S72	S72	S72	S142
K115	R69	R77	R77	R77	R77	R77	T143
T118	R73	L117	L117	L117	L117	L117	T174
G119		S120	S120	S120	S120	S120	E193
D122		T121	T121	T121	T121	T121	M196
		Q122	Q122	Q122	Q122	Q122	Y220
		D161	D161	D161	D161	D161	

METODOLOGIA

Busqueda de estructuras y secuencias

PDB, NCBI

ABP, AMPA, KA, NR2

Alineamiento de secuencias

LALING: NR2B/Periplasmicas

ClustalW: NR2ABCD, NR2 especies

Mutaciones de las regiones alineadas

1ggg, ligadora de Gln

Spdviewer 3,7b

Docking de estructuras y ligandos

Glutamato y NMDA

Gramm

Analisis de estructuras

Identificación de residuos de interacción con ligandos

Secuencias de proteínas trabajadas

Secuencias:

NR2B

Rattus Norvegicus GI-548372

Human GI-14548162

Mus musculus GI-20834664

NR2A GI-2155310

NR2B GI-508292

NR2C GI-475550

NR2D GI-475552

ClustalW

LALING

1GGG: Proteína periplásmica ligadora de glutamina
E-Coli, 238 residuos, 1,9A de resolución.

Herramientas computacionales

PDB

www.rcsb.org/pdb/

NCBI

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.expasy.ch

LALING

Alineamiento múltiple de segmentos de dos secuencias. Blosum 50

www.expasy.ch

ClustalW

Alineamiento de múltiples secuencias. Identifica residuos idénticos, parecidos, genera secuencia consenso Blosum

Spdviewer 3,7b

www.expasy.org/spdbv

Mecánica molecular, visualización de estructuras, cálculo de puentes de H, identificación de residuos, mutaciones, minimización de energía.

Gramm

Reco3.ams.sunysb.edu/gramm/

Docking

FUNDAMENTO DE LOS PROGRAMAS

Mecánica Molecular - spdvb

$$E = \sum k_b (r - r_o)^2$$

ENLACES

$$E = \sum k_\theta (\theta - \theta_o)^2$$

ANGULOS

$$E = \sum A [1 + \cos(n\tau - \phi)]$$

ANGULOS DE TORSION

$$E = \sum_i \sum_j \frac{-A_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}} + \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

INTERACCIONES

Algoritmo de reconocimiento geométrico - GRAMM

Funciones discretas

$a_{l,m,n} = 1$ en la superficie de la molécula

= ρ dentro de la molécula

= 0 fuera de la molécula

$b_{l,m,n} = 1$ en la superficie de la molécula

= δ dentro de la molécula

= 0 fuera de la molécula

$l,m,n = 1 \dots N$

$$C_{\alpha\beta\gamma} = \sum_{l=1}^N \sum_{m=1}^N \sum_{n=1}^N a_{l,m,n} * b_{l+\alpha, m+\beta, n+\gamma}$$

Funcion de
correlación

RESULTADOS

ALINEAMIENTOS:

- NR2B de *rattus norvegicus*
- 1GGG

ABP	Sec. NR2B	% de identidad
2lao	721 - 792	28,20
	490 - 548	16,90
	716 - 737	43,50
1ggg	494 - 545	32,70
	614 - 797	25,90
	261 - 283	47,80



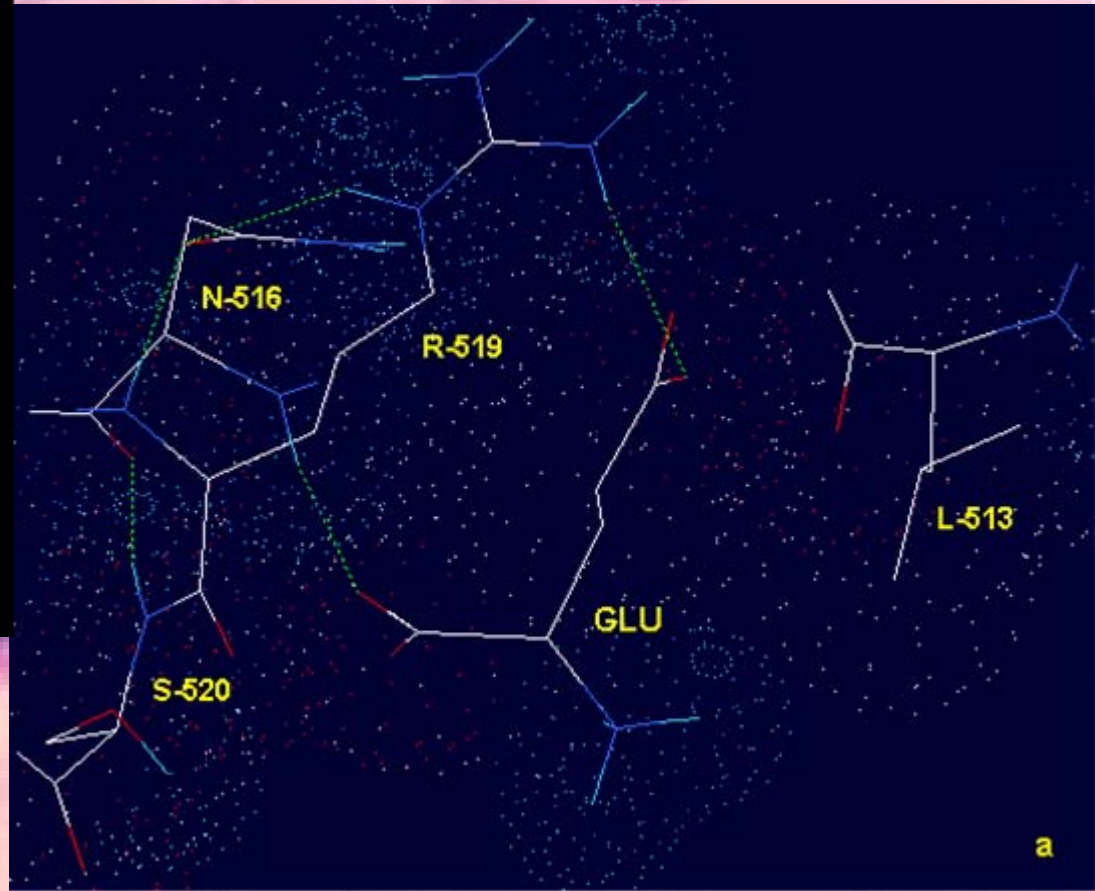
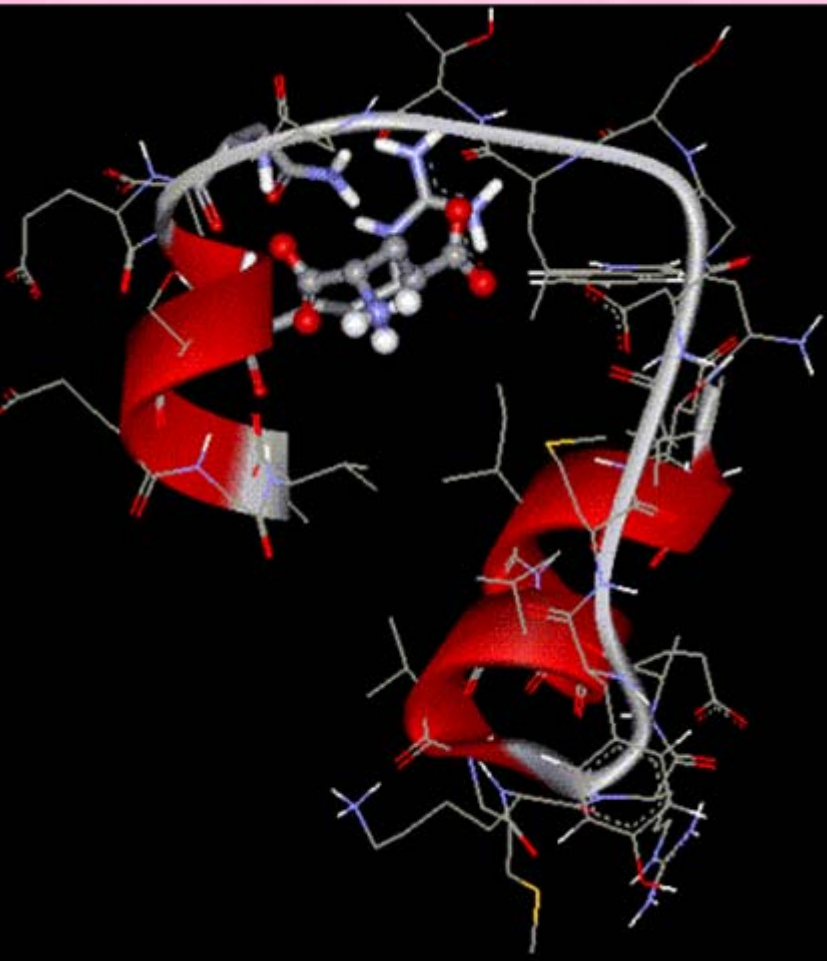
Secuencia de NR2B y la topología propuesta

>gi|508292|gb|AAA50554.1| NMDAR2B glutamate receptor subunit
[Rattus norvegicus]

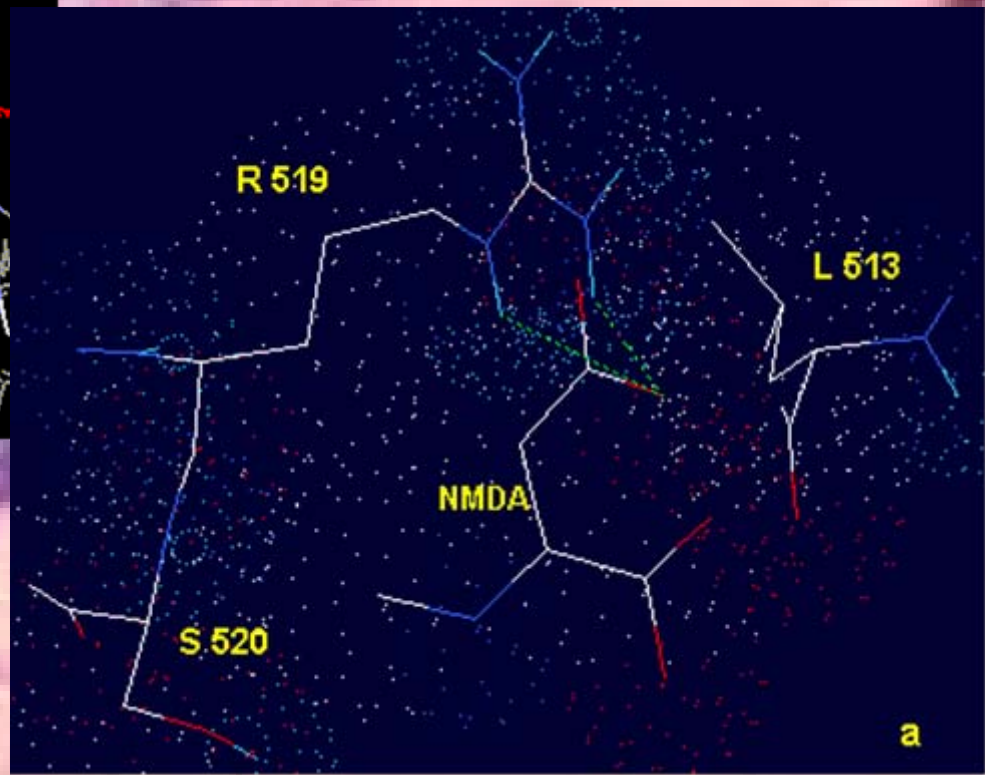
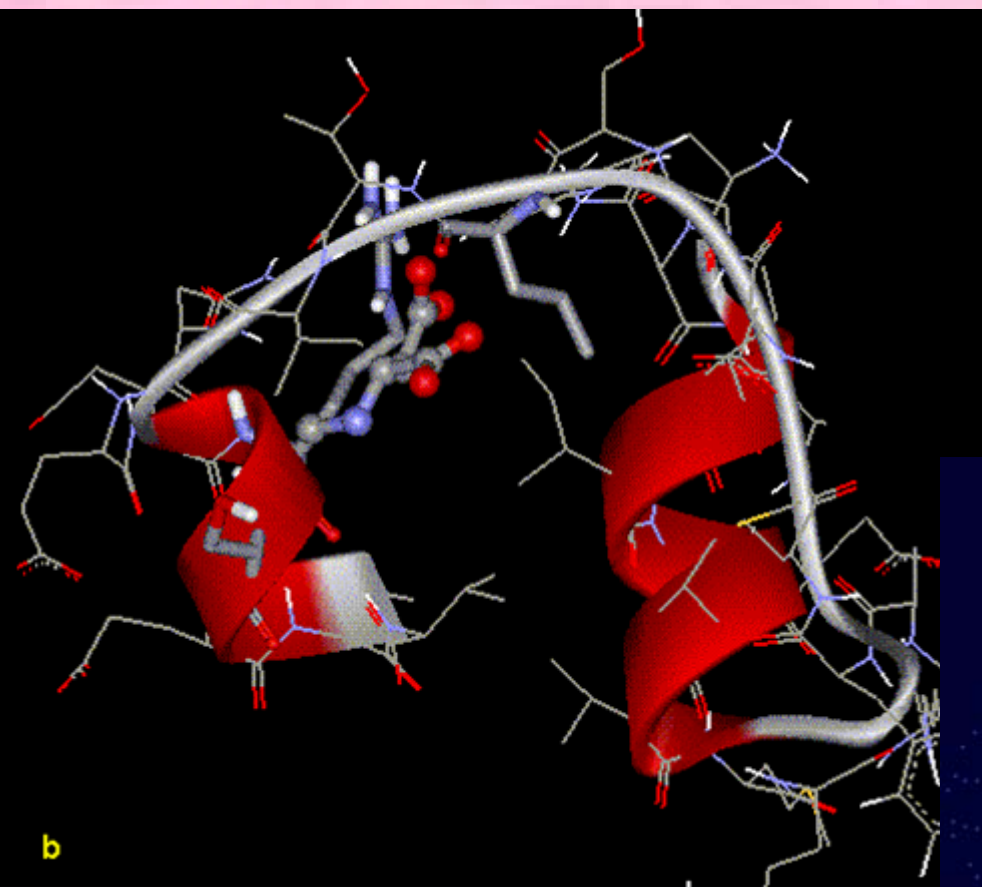
MKPSAECCSPKFWLVLAVLAVSGSKARSQKSPPSIGIAVILVGTSD~~EV~~AIKDAHEKDDFHL**SVVPRVEL**
WANMETDPKSIITRICDLHSDRKIQGVVFADDTDQEAIAQILDFISAQTLTPILGIGHGSSHIDADEDES
SMFFQFQPSIEQQASVHLNDQEXDWFYIFSIVTTYFPGYQDFVNIKRSYIENSFVGVLEEEVLLIDMSLD
DQDSKIQHQLKKLQSPIILLYCTKEEATYIFEVANSVQLTGYGYTWIYVPSLVAQDTPVPSFPPTGLISV
SYDEWDYGLPARVRDGI~~AIITTAASDHLSEHSF~~IPEPKSSCYN**THEKRIYQ**SNILHRYLINVTFEGRLS
FSE~~DGYQ~~MPKLVITLLN**KERKWERV**QKWKDKSLQMKYYVWP**MC**PETEEQEDDHL**SIV**YLEAPFVIVE
SVDPLSGT**CH**HTVP**CQ**KRIISEK**TDEE**PGYIRK**CCKGF**CIDILKRI**SKSVK**FYDLYLV**TNGKHG**KKI
HGT**WGH**IGEV**HKRA**YH**AVG**SL**TINEER**SEV**VD**FSV**PF**IETG**ISV**WVSR**SNGT**WSP**S**AFL**EP**FSAD**VW**
MHFV**ML**IV**S**AVAV**V**F**F**E**F**SP**V**G**Y**HR**CL**AD**G**RE**P**G**P**S**F**T**I**G**K**A**I**W**L**L**H**Q**L**V**F**H**S**V**V**Q**M**P**K**G**T**T**S**K**I**
HV**S**W**A**F**F**AV**I**FL**A**S**Y**T**A**N**L**A**A**F**H**I**Q**E**E**Y**D**Q**V**S**Q**L**S**D**K**K**F**Q**R**P**H**D**F**S**P**P**R**F**G**T**V**P**H**G**S**T**E**R**N**I**R**H**Y**A
EN**H**A**Y**H**G**K**F**H**Q**R**G**V**D**D**A**L**L**S**L**K**T**G**K**L**D**A**P**I**Y**D**A**A**V**L**N**Y**M**A**G**R**D**E**G**C**K**L**V**T**I**G**S**G**K**V**F**A**S**T**G**Y**G**I**A**I**Q**K**D**S
GW**K**R**Q**V**D**L**A**T**L**Q**L**F**G**D**G**E**E**L**E**A**L**W**L**T**G**I**C**H**N**E**K**H**E**V**M**S**S**Q**L**D**I**D**H**A**G**V**F**Y**N**L**G**A**M**A**L**S**L**I**T**F**I**C**E**N
LF**Y**W**Q**F**R**H**C**F**H**G**V**C**S**G**K**P**G**H**V**F**S**I**S**R**G**I**Y**S**C**H**G**W**A**I**E**R**Q**S**V**M**S**P**T**A**T**I**D**N**T**H**S**I**L**R**L**L**R**T**A**K**H**A**H**
LS**G**V**H**G**S**P**Q**S**A**L**D**F**I**R**R**E**S**S**V**Y**D**I**S**E**H**R**R**S**F**T**H**S**D**C**K**S**X**H**P**P**C**E**K**L**F**S**D**Y**I**S**E**V**E**R**T**F**G**H**L**Q**L**E**D**S**V**
YQ**D**H**Y**I**D**D**H**R**P**H**S**I**G**S**T**S**S**I**D**G**L**Y**D**C**D**N**P**P**F**T**T**Q**P**R**S**I**S**K**P**L**D**I**G**L**P**S**S**K**S**Q**L**S**D**L**Y**G**K**F**S**F**K**S**D**R**Y**S
GH**D**D**L**I**R**S**D**V**S**D**I**S**T**H**T**V**T**Y**G**H**I**E**G**H**A**A**K**R**R**K**Q**Y**K**D**S**L**K**R**P**A**S**A**K**S**R**E**F**D**E**I**E**L**A**Y**R**R**R**P**P**R**S**P**D**H**K**
RY**F**R**D**K**E**G**L**R**D**F**Y**L**D**Q**F**R**T**K**E**N**S**P**H**F**E**H**V**D**L**T**D**I**Y**K**E**R**S**D**F**K**R**D**S**V**S**G**G**O**P**C**T**H**R**S**H**L**K**H**O**T**G**E**R**H**O**V
GO**V**P**A**P**W**E**K**L**T**H**V**D**W**E**D**R**S**G**H**F**C**R**S**C**P**S**K**L**H**H**Y**S**S**T**V**A**G**Q**N**S**G**R**Q**A**C**I**R**C**E**A**C**K**R**A**G**H**L**Y**D**I**S**K**D**H**S**L
QE**L**D**Q**P**A**A**P**V**A**V**T**S**H**A**S**S**T**K**Y**P**Q**S**P**T**H**S**K**A**Q**K**H**R**K**L**R**R**Q**H**S**Y**D**T**F**V**D**L**Q**K**E**A**A**L**A**P**R**S**V**S**L**K**D**E**R**F
HD**G**S**P**Y**A**H**F**E**M**P**A**G**E**S**S**P**A**N**K**S**S**V**P**T**A**G**I**D**H**H**P**G**S**G**H**L**S**K**S**L**Y**D**R**V**T**Q**H**F**F**I**P**T**F**G**D**D**Q**C**L**L**H**G**S**K
SY**F**T**R**Q**P**T**V**A**G**A**S**K**T**R**P**D**F**R**A**L**V**T**K**P**V**S**A**L**H**G**A**V**P**G**R**F**Q**K**D**I**C**I**G**H**Q**S**N**P**C**V**P**H**K**H**P**R**A**F**H**G**S**S**H**G
WY**E**K**L**S**S**I**E**S**D**V

Péptido señal ■ Región extracelular ■ Región intracelular ■ Regiones transmembranales ■
Región extracelular homologa con 1 ggg ■

Modelo para el sitio de unión del glutamato en la región amino terminal

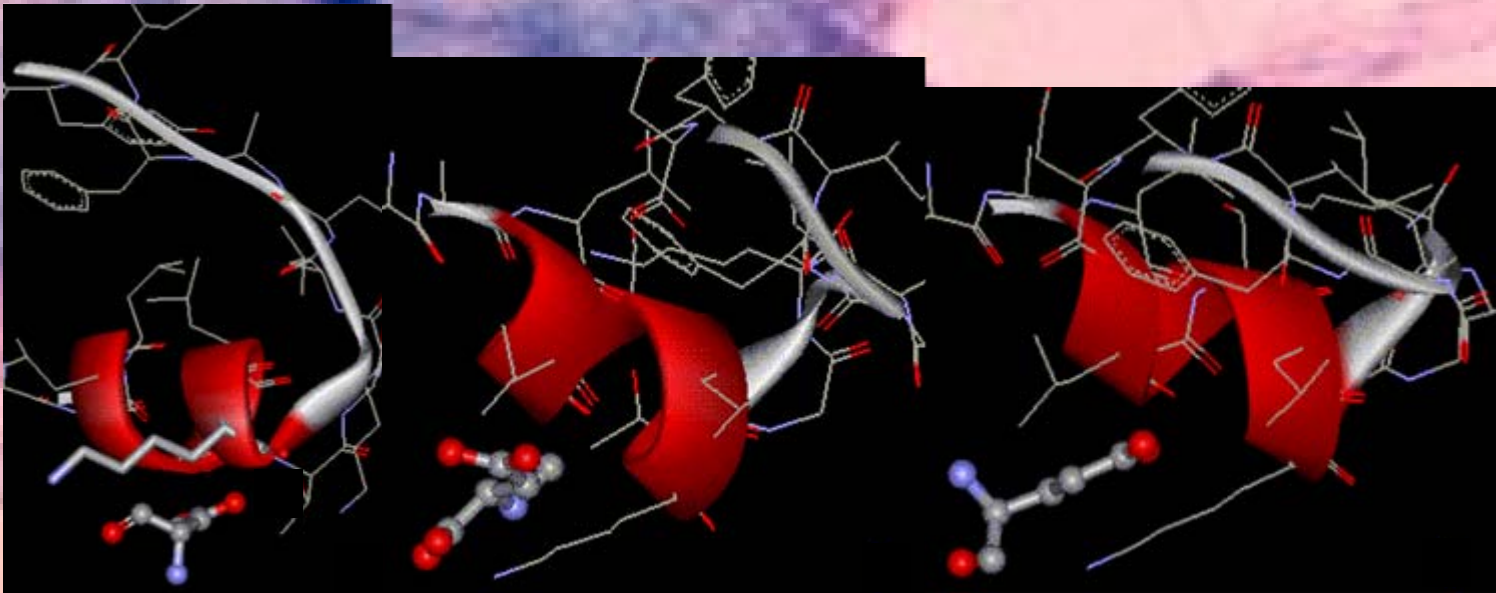


Modelo para el sitio de unión de NMDA en la región amino terminal

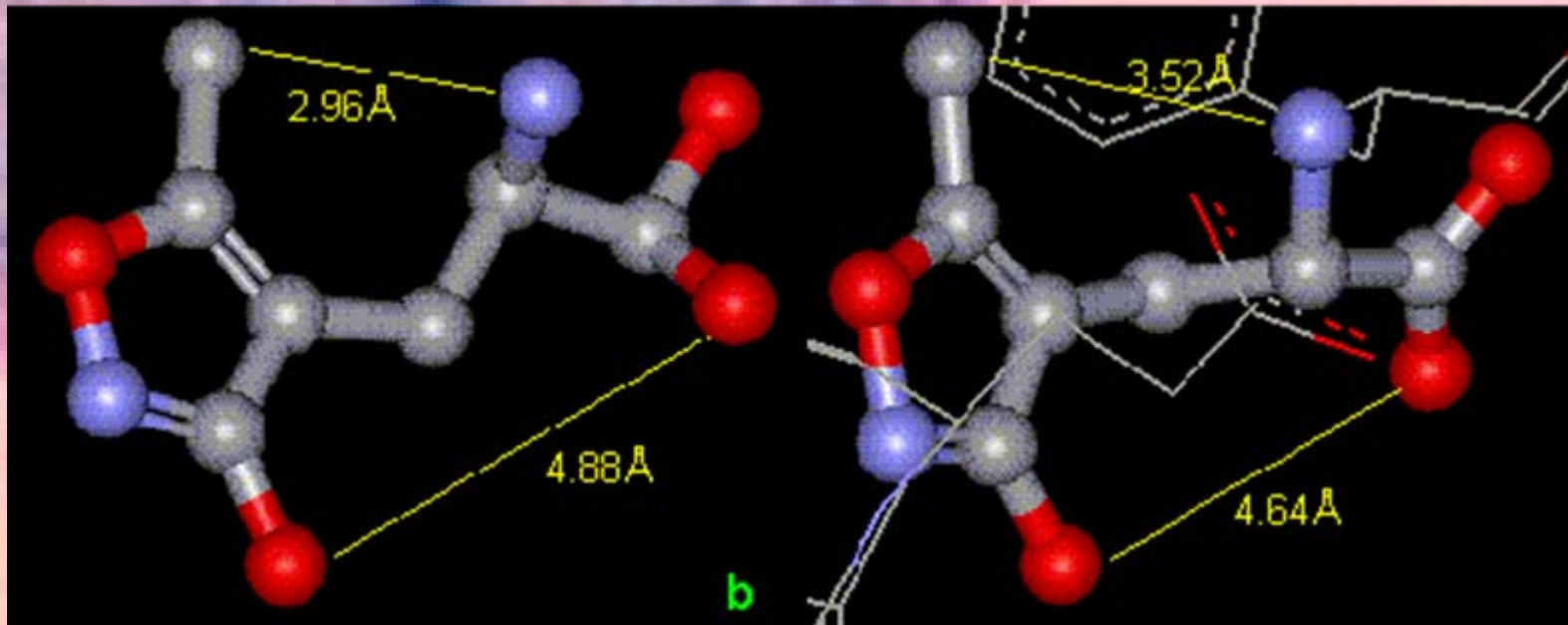
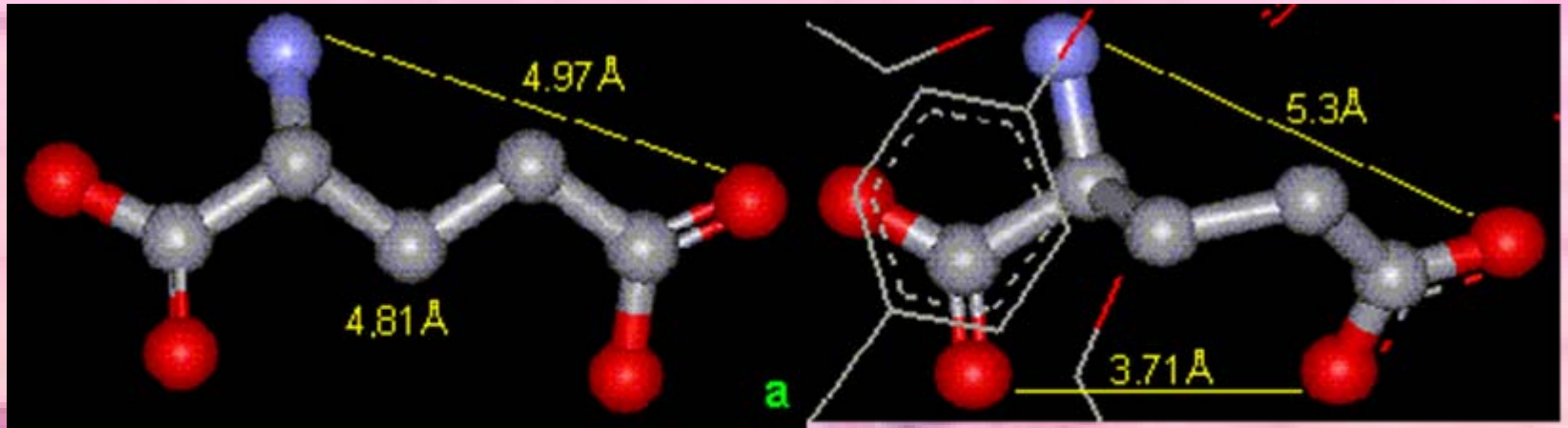


Región entre las zonas transmembranales TM4 y TM5

- La región entre las zonas transmembranales TM4 y TM5, en el “docking” no mostró una interacción significativa del glutamato y NMDA.
- Esta región no es determinante para la unión del ligando



El ligando también sufre modificaciones en la interacción



CONCLUSIONES

- ✿ Es posible utilizar las proteínas periplasmicas como modelo para estudiar el mecanismo de interacción del receptor con el glutamato y NMDA debido a que estas proteínas tienen su estructura resuelta y el tipo de ligando que enlazan son aminoácidos con grupos funcionales comunes, que interactúan mediante mecanismos similares.
- ✿ El mecanismo de interacción ligando – receptor está determinado por interacciones electrostáticas tipo puente de hidrógeno y puentes salinos entre los grupos carboxilo y amino del ligando, con las cadenas laterales de los residuos R-519, N-515, algunas interacciones de Van der Wals con S-520. Esto brinda herramientas teóricas importantes para el diseño de agonistas y antagonistas.
- ✿ De las dos regiones homólogas de 1GGG con NR2B solo la región amino terminal presentó un sitio de unión del ligando con interacciones significativas. La unión del glutamato estaría determinada por la estructura y secuencia en la zona amino terminal.

CONCLUSIONES

- Diferente al comportamiento de los receptores GluR2, donde la subunidad S1S2, formada por dos regiones extracelulares, determina la unión de los ligandos. Este modelo propone la interacción del glutamato y NMDA en una sola región del dominio extracelular.
- Las modificaciones conformacionales debidas a la interacción ligando – receptor no suceden únicamente a la estructura del receptor, sino también al ligando que debe encontrar la mejor conformación para interactuar con los residuos en el sitio de unión.

SUGERENCIAS

- Realizar la valoración experimental del mecanismo mediante técnicas de mutagénesis sitio dirigida
- Realizar validaciones experimentales con combinaciones quiméricas de las variantes A, C y D de NR2B para encontrar la influencia del tipo de subunidad en el funcionamiento del canal.



AGRADECIMIENTOS