



Fundação Universidade Federal do ABC
Pró reitoria de pesquisa
Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP
09210-580
Bloco L, 3º Andar, Fone (11) 3356-7617
iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido
para avaliação no Edital: **04/2022**

Título do projeto:

“Estudo das possíveis combinações hetero-pentaméricas de parálogos de GABA_AR e seu efeito na capacidade de ligação de pequenas moléculas”

Palavras-chave do projeto: GABA_AR , receptores GABA, modelagem molecular, docking molecular, dinâmica molecular.

Área do conhecimento do projeto: Modelagem Molecular, Biofísica

Resumo

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um aminoácido não proteico presente em diversas espécies na natureza. É conhecido por ser o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) em mamíferos, desempenhando papéis importantes na modulação sináptica, desenvolvimento neuronal, relaxação e tônus muscular.¹ Baixos níveis de GABA no cérebro está associado a alguns transtornos como ansiedade, mania, depressão e convulsões, principalmente devido a superexpressão de alguns receptores, transportadores e enzimas.

Existe na literatura um grande número de ligantes conhecido para receptor GABA_A. Além disso dispomos de varias estruturas experimentais heteropentaméricas. Como o arranjo de combinações das subunidades heteropentaméricas poder determinar diferentes efeitos biológicos poderia ser de extrema importância identificar ligantes que possam ser específicos a determinadas combinações pentaméricas seja por ligação específica ou por diminuição de afinidade. Nesse caso temos interesse especial em ligantes que atuem dentro do canal de Cl como observado na estrutura 6hug(pdb)¹².

Estudar os mecanismos estruturais e moleculares que podem levar a uma especificidade para hetero-pentâmeros pode ser de grande importância para o desenvolvimento futuro de drogas mais específicas.

Introdução e Justificativa

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um aminoácido não proteico presente em diversas espécies na natureza. É conhecido por ser o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) em mamíferos, desempenhando papéis importantes na modulação sináptica, desenvolvimento neuronal, relaxação e tônus muscular.¹ Baixos níveis de GABA no cérebro está associado a alguns transtornos como ansiedade, mania, depressão e convulsões, principalmente devido a superexpressão de alguns receptores, transportadores e enzimas.²

Os receptores GABA podem ser divididos em dois tipos, os ionotrópicos, que são canais de íons (GABA_A); e acoplados a proteína-G ou metabotrópico (GABA_B).¹ Os receptores GABA_B são acoplados a canais de cálcio e potássio via proteína G e segundos mensageiros. Gaba-B participa da transmissão sináptica lenta que está relacionada à memória, emoção e dor. Além disso, a ativação de GABA_B R pode inibir a transmissão de serotonina, sendo a redução desse neurotransmissor relacionado com o desenvolvimento de depressão.³

Já os GABA_A R (Figura 1) são canais de íons cloro aberto por GABA e modulado alostericamente por uma variedade de moléculas como benzodiazepinas, anestésicos, barbitúricos e esteróides neuroativos.⁴ São os receptores de neurotransmissores mais abundantes, principalmente encontrados em neurônios na sinapse, pré e pós fenda sináptica. Mas também podem ser encontrados em outras regiões além do sistema nervoso central. Este receptor é encontrado na forma de pentâmero e os monômeros que o constituem são formados a partir de subunidades, as diferentes combinações de subunidades são chamadas de subtipos.¹

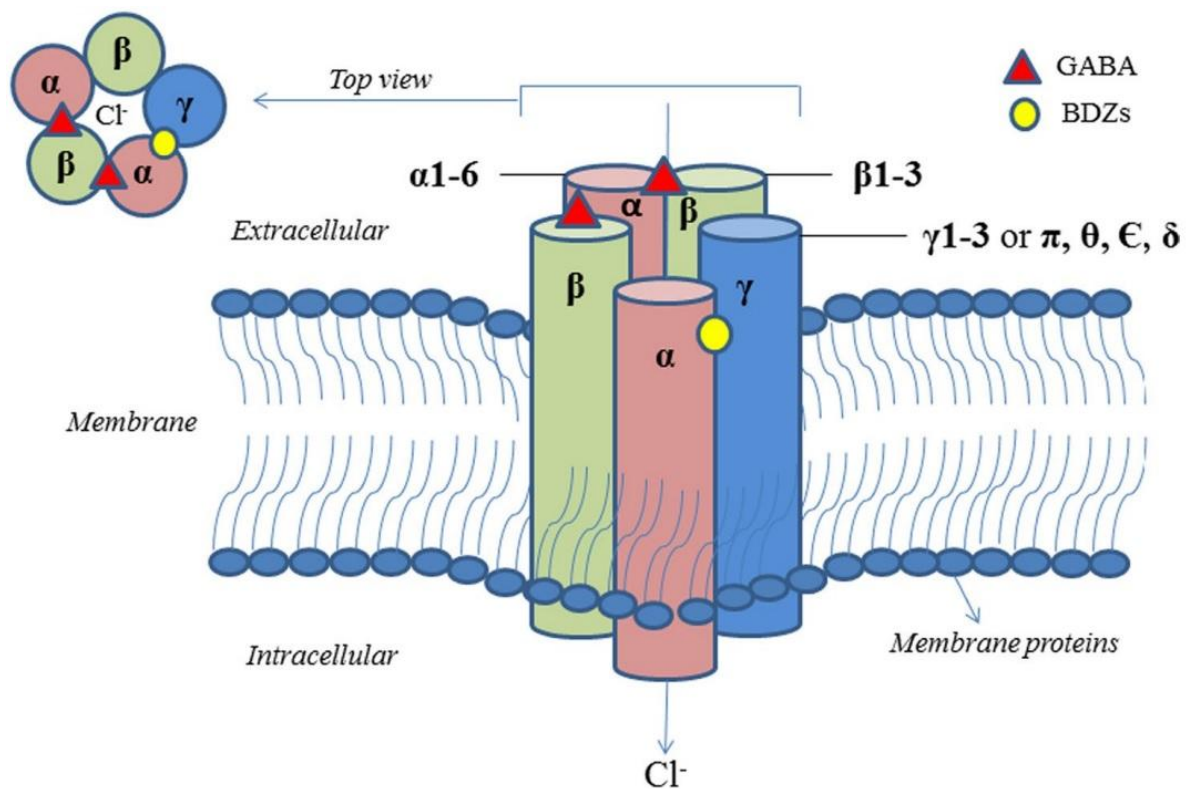


Figura 1: Representação do receptor GABA_A. Ref 2

São identificadas e sequenciadas 19 subunidades desses receptores distribuídos no SNC de mamíferos, sendo 6 α , 3 β , γ 3, 1 δ , 1 ϵ , 1 π , 1 θ e 3 ρ .^{1,4} Esse número cresce a partir do splicing alternativo, permitindo que os genes das subunidades β 2, γ 2, γ 3 e ρ 1 produzam pelo menos duas proteínas diferentes, contudo, em termos de atividade do receptor apenas duas isoformas da subunidade γ 2, γ 2L e γ 2S, apresentaram diferença de atividade. Em humanos as subunidades são formadas de longas cadeias de aminoácidos (420-632) e pesam de 52 a 59 KDa. Elas possuem um domínio extracelular N-terminal de 220-250 resíduos, que podem ser glicosilados, além de 4 domínios transmembranares (M ou TM?) (M1, M2, M3 e M4) e um curto domínio extracelular C-terminal.¹

Em uma distribuição randômica das subunidades, seria possível em torno de 150 mil combinações diferentes, contudo, é estimado que cerca de apenas 500 formam subtipos funcionais.^{1,4} A maioria dos receptores nativos são compostos das subunidades $\alpha\beta\gamma$. As subunidades δ , ϵ e π parecem aptas para substituir as subunidades alfa, enquanto as subunidades θ podem substituir a β . Contudo, carecem estudos sistemáticos sobre receptores GABA_A contendo as subunidades ϵ , π ou θ . Ainda, têm-se evidências de que quando o receptor é composto por $\alpha\beta\gamma$

encontra-se na proporção 2:2:1, em que quatro subunidades alternadas de $\alpha\beta$ são conectadas por uma γ . E receptores $\alpha\beta\delta$, $\alpha\beta\epsilon$ ou $\alpha\beta\pi$ apresentam a mesma estequiometria. Subunidades ρ normalmente não se conecta com outras classes de receptores GABA_A. O subtipo mais comum encontrado no SNC de mamíferos (cerca de 60%) é o $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. Outros bastante encontrados são $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ e $\alpha_3\beta_3\gamma_2$, seguidos de $\alpha_4-6\beta\gamma_2$, $\alpha_6\beta_2-3\delta$, $\alpha_4\beta_2-3\delta$ e ρ_1-3 , e em menor quantidade, $\alpha_1\beta\delta$, $\alpha_2\beta_1\gamma_1$, $\alpha\beta\epsilon$, $\alpha\beta\pi$, $\alpha\beta\theta$, $\alpha_1\alpha_6\beta\gamma_2$, $\alpha_1\alpha_6\beta\delta$ e $\alpha\beta\gamma_3$.^{1,4}

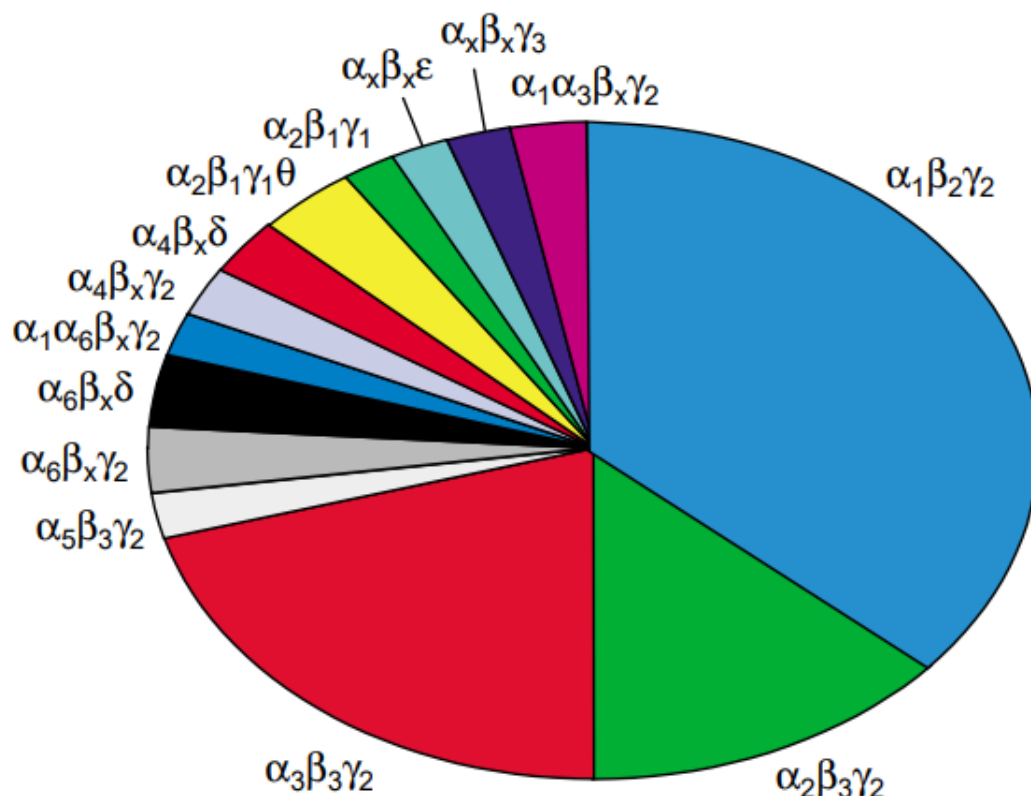


Figura 2: Representação aproximada da abundância dos subtipos de receptores GABA_A no cérebro de ratos. Os subscritos x indicam que não se sabe ao certo o tipo da subunidade. Lembrando que é apenas uma representação superficial, existem diversas outras combinação de subunidades funcionais. Ref 12

Usualmente apenas três sítios de ligações podem ser estudados a partir de ligantes radioativos: o GABA, benzodiazepina, e t-butil-biciclofosforotionato (TBPS)/sítio de ligação da picrotoxina. A partir desses estudos é possível verificar a competitividade entre os compostos que interagem com o sítio de ligação, contudo

essas técnicas não elucidam como a modulação alostérica altera a estrutura do receptor.^{4,5}

Para o sítio de ligação gaba, poucas classes de compostos podem se ligar, contudo, esses compostos normalmente são associados a muitos efeitos colaterais. Agonistas totais gaba que abrem todos os receptores GABA_A indiscriminadamente causam a inibição de muitos sistemas neuronais, além disso, os antagonistas gaba estão associados ao aumento de ansiedade e convulsões. Já as Benzodiazepinas são fortes anticonvulsivantes, relaxante muscular, sedativo e ansiolítico. São capazes de ampliar a ação do gaba nos receptores GABA_A e aumentam a frequência da abertura de canais de íon cloro gaba-induzidos. Esses compostos não eliciam a entrada de cloro na ausência de gaba, reduzindo seu grau de toxicidade.^{1,4}

O sítio de ligação benzodiazepina do receptor GABA_A se encontra na interface da subunidade α e γ .^{1,4} Combinando os 6 diferentes α e 3 γ seria possível 18 subtipos de receptores com sítios de benzodiazepinas. Porém, a maioria dos compostos interagindo com o sítio benzodiazepínico contendo $\gamma 1$ são inativos ou fracamente ativos, e os subtipos contendo $\gamma 3$ possuem alguma atividade mas são pouco abundante. Assim, as benzodiazepinas normalmente prescritas são mediadas predominantemente pelos subtipos $\alpha 1\beta\gamma 2$, $\alpha 2\beta\gamma 2$, $\alpha 3\beta\gamma 2$, ou $\alpha 5\beta\gamma 2$.⁴

Já os subtipos $\alpha 4\beta\gamma 2$ e $\alpha 6\beta\gamma 2$ possuem atividades farmacológicas diferentes. Benzodiazepinas clássicas como diazepam, flunitrazepam, ou clonazepam não interagem com estes receptores. Contudo, as Imidazobenzodiazepines, como flumazenil, interagem com esses receptores e com os acima citados, mas a interação entre os compostos e os subtipos $\alpha 4\beta\gamma 2$ e $\alpha 6\beta\gamma 2$ é fraca e os efeitos moduladores são pouco conhecidos.⁴

Como os subtipos $\alpha 1\beta\gamma 2$, $\alpha 2\beta\gamma 2$, $\alpha 3\beta\gamma 2$, ou $\alpha 5\beta\gamma 2$ são modulados de maneira similar, é esperado que o espectro clínico das benzodiazepinas seja próximo. Apenas algumas drogas, como o zolpidem, exibe uma seletividade maior para a subunidade $\alpha 1$.⁴ Porém, a partir dos anos 2000 têm-se desenvolvido moléculas com afinidades mais específicas para alguns subtipos de receptores, principalmente $\alpha 5$, pois além de estar relacionado à memória e aprendizado, testes em animais mostram que alguns compostos melhoram a cognição sem efeitos ansiogênicos e convulsões, tendo assim um potencial relevante para algumas desordens cognitivas, como o Alzheimer.^{4,6,7}

Já o TBPS e picrotoxina são convulsivantes que não competitivamente bloqueiam canal de íons cloro por se ligarem a um ou mais sítios próximos ao canal. O TBPS mostra ação mais lenta em experimentos eletrofisiológicos, mas é uma boa opção para estudar o sítio de ligação da picrotoxina por ter uma alta afinidade por este sítio. Já a picrotoxina aparece com uma ação inibitória rápida com adições repetitivas de GABA, e diminui a velocidade na ausência de GABA, sugerindo que o canal aberto facilita sua ação. Além disso, este sítio também pode ser alostericamente inibido por agonistas do sítio de ligação GABA, ainda, compostos que abrem alostericamente o canal de íons GABA (barbitúricos, etazolato) reduzem a ligação do TBPS.⁴

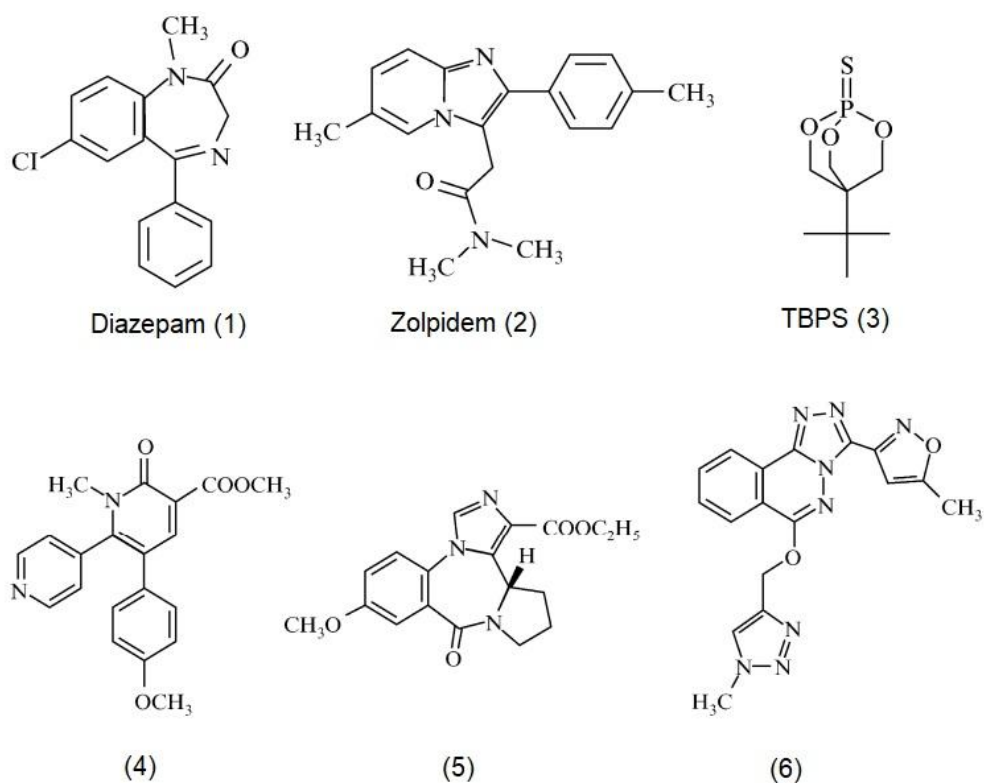


Figura 3: Ligantes do receptor GABA_A. Compostos 1 e 2 são agonistas do sítio benzodiazepínico, composto 3 é um antagonista do receptor GABA_A por inibição alostérica. Compostos 4-6 são benzodiazepinas com seletividade para certos subtipos do receptor GABA_A. Adaptado ref. 4.

Apesar da ampla utilização de medicamentos na modulação desse receptor, os mecanismos de ligação e as mudanças conformacionais provocadas ainda são pouco conhecidas. Em estudos de *docking* molecular são utilizados modelos homólogos como *C. elegans* glutamate-gated chloride channel a (GluCl) (traduzir).

Torpedo receptor nicotínico de acetilcolina ou o homopentâmero humano $\beta 3$ GABA_AR, todos distantes do heteromérico GABA_AR fisiológico.⁵

Dessa forma, é importante o estudo mais fino dos receptores benzodiazepínicos, pois os medicamentos desta classe são bastante utilizados para uma série de distúrbios e sintomas, que incluem ansiedade, insônia, alcoolismo, psicose, epilepsia e adjuvantes para anestésicos. Ainda, os efeitos de longo prazo, que podem causar demência, declínio cognitivo, distúrbios psicomotores, além de tolerância e dependência dos medicamentos. Maiores pesquisas sobre o real consumo dos medicamentos no Brasil são dificultados pelo alto número de compras sem o uso de receitas e pela falta de unificação dos dados necessários, contudo uma pesquisa de 2018 estimou que cerca de 6% da população havia feito uso de benzodiazepínicos no último ano.⁸

Porém, para os fármacos serem mais específicos aos receptores e causarem menos efeitos colaterais é necessário conhecer melhor a estrutura do receptor e como as modulações alteram sua estrutura. Estudos recentes têm mostrado a eficiência da técnica de microscopia eletrônica criogênica (Cryo-EM) para a visualização de estruturas de macromoléculas com resolução próxima ao átomo (próximo de 4 Å).^{5,9,10} Graças a diversos avanços como detecção direta de elétrons aliado ao desenvolvimento de algoritmos robustos para correção e indução de movimento, coleta e análise das imagens leva essa técnica a ser uma das principais na análise estrutural de amostras biológicas.

Justificativa

Existe na literatura um grande número de ligantes conhecido para receptor GABA_A. Entretanto as estruturas experimentais abarcando todo complexo pentâmero só foram obtidas recentemente via Cryo-EM^{11, 12,13}. Tais estruturas mostram uma gama de ligantes alostéricos nas mais variadas localizações, muitas delas em interface entre duas subunidades diferentes e algumas no canal, tendo inclusive um ligante com interface cada uma das 5 subunidades¹³. Como o arranjo de combinações das subunidades heteropentaméricas poder determinar diferentes efeitos biológicos poderia ser de extrema importância identificar ligantes que possam ser específicos a determinadas combinações pentâmeras, seja por ligação específica ou por diminuição de afinidade. Nesse caso, temos interesse especial

em ligantes que atuem dentro do canal de Cl como observado na estrutura 6hug(pdb)¹².

Estudar os mecanismos estruturais e moleculares que podem levar a uma especificidade para hetero-pentâmeros pode ser de grande importância para o desenvolvimento futuro de drogas mais específicas.

Objetivos

Objetivo geral

Identificar possíveis mecanismos estruturais de seletividade de moléculas para hetero-pentâmeros de GABA_Ar. Tal seletividade pode ser oriunda de não ligação ou perda de afinidade. Identificação de mecanismo desse tipo podem ajudar futuramente na criação de drogas específicas para determinados hetero-pentâmeros.

Objetivo específico

Para conseguir o objetivo proposto pretendemos fazer uma procura de possíveis ligantes para diferentes parálogos de GABA_Ar seja na literatura ou em bancos como bindingdb e chemBL. Além disso, o estudante fará procura por estruturas resolvidas experimentalmente e dados bioquímicos de combinações possíveis de heteropentâmeros de GABA_Ar. Caso seja necessário, serão criados modelos teóricos de pentâmeros. Dessa forma, podemos definir alvos (estruturas) e moléculas para etapa de docking molecular. As análises de docking molecular podem mostrar diferenças de ligação específica. Depois disso, os sistemas que se mostrarem mais interessantes serão testados por dinâmica molecular para verificar diferenças de estabilidade no sítio de ligação. Por último, tendo como base os dados procuraremos em bancos de moléculas via virtual screening molecular para o sítio de interesse que poderiam ter afinidade específica.

Metodologia

- 1) procura na literatura e em bancos de dados **pdb** (<https://www.rcsb.org/>) ; **binddb** (<https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp>) ; **chembl** (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>)

- 2) docking molecular com usando programa AutoDock-GPU¹⁴.
- 3) dinâmica molecular em sistema de bicamada lipídica e solvente explícito usado o programa GROMACS¹⁵. com montagem do sistema na interface charmm-GUI¹⁶.
- 4) docking molecular com molecular não conhecidas na literatura e identificar no site ZINC (<https://zinc.docking.org/>).
- 5) escrita do relatório

Cronograma de Atividades

atividade\Mês	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2)		x	x	x	x							
3)					x	x	x	x	x	x		
4)									x	x	x	
5)										x	x	x

Referências

- 1 -Sallard E, Letourneur D, Legendre P. Electrophysiology of ionotropic GABA receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(13):5341-5370. doi:10.1007/s00018-021-03846-2
- 2 - Bhagat K, Singh JV, Pagare PP, et al. Rational approaches for the design of various GABA modulators and their clinical progression. *Mol Divers.* 2021;25(1):551-601. doi:10.1007/s11030-020-10068-4
- 3 - Lin J, Ling F, Huang P, et al. The Development of GABAergic Network in Depression in Recent 17 Years: A Visual Analysis Based on CiteSpace and VOSviewer. *Front Psychiatry.* 2022;13:874137. Published 2022 May 18. doi:10.3389/fpsy.2022.874137
- 4 - Sieghart, W. (2006). Structure, Pharmacology, and Function of GABAA Receptor Subtypes. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 54, pp. 231–263). [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(06\)54010-4](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(06)54010-4)
- 5 - Masiulis S, Desai R, Uchański T, Serna Martin I, Lavery D, Karia D, Malinauskas T, Zivanov J, Pardon E, Kotecha A, Steyaert J, Miller KW, Aricescu AR. GABAA receptor signalling mechanisms

revealed by structural pharmacology. *Nature*. 2019 Jan;565(7740):454-459. doi: 10.1038/s41586-018-0832-5. Epub 2019 Jan 2. Erratum in: *Nature*. 2019 Feb 7;: PMID: 30602790; PMCID: PMC6370056.

6 - Clayton T, Poe MM, Rallapalli S, Biawat P, Savić MM, Rowlett JK, Gallos G, Emala CW, Kaczorowski CC, Stafford DC, Arnold LA, Cook JM. A Review of the Updated Pharmacophore for the Alpha 5 GABA(A) Benzodiazepine Receptor Model. *Int J Med Chem*. 2015;2015:430248. doi: 10.1155/2015/430248. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26682068; PMCID: PMC4657098.

7 - Janković SM, Dješević M, Janković SV. Experimental GABA A Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Focal Epilepsy. *J Exp Pharmacol*. 2021 Mar 8;13:235-244. doi: 10.2147/JEP.S242964. PMID: 33727865; PMCID: PMC7954424.

8 - Madruga CS, Paim TL, Palhares HN, Miguel AC, Massaro LTS, Caetano R, et al. Prevalence of and pathways to benzodiazepine use in Brazil: the role of depression, sleep, and sedentary lifestyle. *Braz J Psychiatry*. 2018;00:000-000. [http:// dx.doi.org/10.1590/1516-4446-2018-0088](http://dx.doi.org/10.1590/1516-4446-2018-0088)

9 - Binshtein E, Ohi MD. Cryo-electron microscopy and the amazing race to atomic resolution. *Biochemistry*. 2015 May 26;54(20):3133-41. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00114. Epub 2015 May 14. PMID: 25955078.

10 - Lyumks, Dmitry. Challenges and opportunities in cryo-EM single-particle analysis. *Journal of Biological Chemistry*. Mar 2019. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.005602>

11 - Liu S, Xu L, Guan F, Liu YT, Cui Y, Zhang Q, Zheng X, Bi GQ, Zhou ZH, Zhang X, Ye S. Cryo-EM structure of the human $\alpha 5\beta 3$ GABAA-receptor. *Cell Res*. 2018 Sep;28(9):958-961. doi: 10.1038/s41422-018-0077-8. Epub 2018 Aug 23. PMID: 30140029; PMCID: PMC6123483.

12: Masiulis S, Desai R, Uchański T, Serna Martin I, Lavery D, Karia D, Malinauskas T, Zivanov J, Pardon E, Kotecha A, Steyaert J, Miller KW, Aricescu AR. GABA_A receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature*. 2019 Jan;565(7740):454-459. doi: 10.1038/s41586-018-0832-5. Epub 2019 Jan 2. Erratum in: *Nature*. 2019 Feb 7;: PMID: 30602790; PMCID: PMC6370056.

13 - Kim JJ, Hibbs RE. Direct Structural Insights into GABA_A Receptor Pharmacology. *Trends Biochem Sci*. 2021 Jun;46(6):502-517. doi: 10.1016/j.tibs.2021.01.011. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33674151; PMCID: PMC8122054.

14: Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009 Dec;30(16):2785-91. doi: 10.1002/jcc.21256. PMID: 19399780; PMCID: PMC2760638.

15: Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR, Smith JC, Kasson PM, van der Spoel D, Hess B, Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*. 2013 Apr 1;29(7):845-54. doi: 10.1093/bioinformatics/btt055. Epub 2013 Feb 13. PMID: 23407358; PMCID: PMC3605599.

16: Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface

for CHARMM. J Comput Chem. 2008 Aug;29(11):1859-65. doi: 10.1002/jcc.20945.
PMID: 18351591.

14: Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009 Dec;30(16):2785-91. doi: 10.1002/jcc.21256. PMID: 19399780; PMCID: PMC2760638.