

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Descrição *ab initio* do ancoramento do receptor de glicina pela proteína gefirina.**

**Alessandro Witczak**

**Porto Alegre  
2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Descrição *ab initio* do ancoramento do receptor de glicina pela proteína gefirina.**

**Alessandro Witczak**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Gottfried  
Co-orientador: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire

**Porto Alegre  
2012**

**Seja gentil sempre que possível.**

**Sempre é possível.**

**Dalai Lama**

## **AGRADECIMENTOS**

Eu gostaria de agradecer aos colaboradores que tornaram possível o presente trabalho, principalmente à professora e orientadora Carmem Gottfried, pela confiança e por proporcionar a chance de realizar este trabalho, ao Geancarlo Zanatta, cuja colaboração foi fundamental e indispensável; e ao Victorio Bambini Júnior, o qual colaborou de forma ampla e decisiva, do início ao fim da realização dessa dissertação.

Agradecimentos também ao pessoal da Universidade Federal do Ceará, cuja parceria foi de grande valia.

Muito obrigado a todos!

## RESUMO

A eficiência da transmissão sináptica no sistema nervoso central está associada com a densidade na concentração de canais iônicos operados por ligantes na membrana pós-sináptica. A gefirina, uma proteína de 93 kDa, é um elemento importante na organização dos receptores inibitórios pos-sinápticos, funcionando como uma plataforma de múltiplas interações proteína-proteína, promovendo agrupamento de receptores, de proteínas do citoesqueleto e de proteínas de sinalização efetoras na região da sinapse. A organização estrutural da gefirina compreende três domínios principais denominadas G, E e C. A interação entre gefirina e o receptor de glicina (GlyR) envolve o domínio E da gefirina e a alça citoplasmática localizada entre os seguimentos transmembrana 3 e 4 da subunidade  $\beta$  de GlyR. A associação de mecânica quântica e mecânica molecular no estudo da associação de gefirina-GlyR irá aumentar a compreensão de detalhes anatômicos. Assim, para investigar as características eletrônicas relacionadas aos mecanismos de ancoramento de GlyR pela gefirina nós utilizamos abordagens teóricas de bioquímica quântica. Avaliamos a contribuição energética de cada resíduo de aminoácido na interface molecular do ancoramento entre gefirina e GlyR. As maiores contribuições decorrentes da análise de 34 interações foram, em ordem decrescente:  $-32,09 \text{ kcal mol}^{-1}$ , observado entre os resíduos Asp729 (gefirina) e Ser403 (GlyR);  $-24,04 \text{ kcal mol}^{-1}$  entre Arg653 (gefirina) e Phe398 (GlyR) e  $-23,50 \text{ kcal mol}^{-1}$  entre Asp327(gefirina) e Ser399 (GlyR). A menor interação foi de  $-1,78 \text{ kcal mol}^{-1}$  entre os resíduos de aminoácido Ile656 (gefirina) e Ser399 (GlyR). Todas as interações observadas neste estudo mostraram interação de atração e a soma das contribuições individuais indica uma energia de ligação total de  $-343,49 \text{ kcal/mol}$ . Pela análise da contribuição individual de cada resíduo foi possível determinar a relevância de Asp729 (gefirina) / Ser403 (GlyR), seguido de Arg653 (gefirina) / Phe398 (GlyR), Asp327 (gefirina) / Ser399 (GlyR) e Phe330 (gefirina) / Ile400 (GlyR), entre outros. Estes resultados contribuem para a maior compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na estabilização/ruptura de GlyR na membrana sináptica.

## ABSTRACT

In the central nervous system, a high concentration of ligand-gated ion channels is necessary at the postsynaptic membrane to display efficient synaptic transmission. Gephyrin, a 93 kDa protein, is an important element in the organization of the inhibitory synaptic receptors, as a platform for multiple protein-protein interactions, bringing receptors, cytoskeletal proteins and downstream signaling proteins into close spatial proximity. This protein consists of three major domains named G, E and C. The interaction between gephyrin and the glycine receptor (GlyR) involves the E-domain of gephyrin and a cytoplasmic loop located between transmembrane segments 3 and 4 of the GlyR  $\beta$  subunit. Combined quantum-mechanics and molecular-mechanics in the gephyrin-GlyR association studies increase the understanding of atomic details. In order to investigate the electronic features involved in the mechanism of the GlyR anchoring by gephyrin we have employed theoretical approaches of quantum biochemistry. The energy contribution of each individual amino acid residues within the molecular interface of the anchorage between gephyrin and GlyR were evaluated. The largest contributions in the analysis of 34 interactions were, in descending order:  $-32.09 \text{ kcal mol}^{-1}$ , observed between residues Asp729 (gephyrin) and Ser403 (GlyR);  $-24.04 \text{ kcal mol}^{-1}$  between Arg653 (gephyrin) and Phe398 (GlyR) and  $-23.50 \text{ kcal mol}^{-1}$  between Asp327 (gephyrin) and Ser399 (GlyR). The smaller interaction was  $-1.78 \text{ kcal mol}^{-1}$  between the amino acid residues Ile656 (gephyrin) and Ser399 (GlyR). All interactions observed in this study showed attractive interaction, and the sum of individual contributions indicate a total binding energy of  $-343.49 \text{ kcal/mol}$ . After the analysis of the individual contribution of each residue we could determine the relevance of Asp729 (gephyrin) / Ser403 (GlyR), followed by Arg653 (gephyrin) / Phe398 (GlyR), Asp327 (gephyrin) / Ser399 (GlyR) and Phe330 (gephyrin) / Ile400 (GlyR), among others. These results increase the understanding of the molecular mechanisms involved in the stabilization/disruption of GlyR in the synaptic membrane.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CC, teoria do conglomerado acoplado  
DFT, teoria do funcional da densidade  
EMBL, Laboratório de Biologia Molecular Europeu  
GABA, ácido gama-aminobutírico  
GABA<sub>A</sub>R, receptor de GABA do tipo A  
GlyR, receptor de glicina  
GTO, orbitais do tipo Gaussianas  
GVB, ligação de valência generalizada  
HF, limite *Hartree Fock*  
HOMO, orbital molecular ocupado mais alto  
IC, interações de configurações  
IUPAC, união internacional de química pura e aplicada  
LDA, aproximação de densidade local  
LUMO, orbital molecular não ocupado mais baixo  
MC, mecânica clássica  
MCSCF, multi-configurações de campo auto consistente  
MFCC, fracionamento molecular com *caps* conjugados  
MoCo, cofator molibdênio  
MM, modelagem molecular  
MPN, teoria da perturbação *Mohlar-Plesset*  
PDB, banco de dados de proteínas  
PDBj, banco de dados de estruturas localizado no Japão  
SCF, campo auto consistente  
SNC, sistema nervoso central  
STO, orbitais do tipo *Slater*  
TM, transmembrana

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
<b>INTRODUÇÃO</b>	
Figura 1. Estrutura geral do receptor de glicina	3
Figura 2. Modelo de formação da rede de ancoramento do receptor de glicina pela gefirina.	5
Figura 3. Representação da gefirina-E em complexo com a alça $\beta$ do GlyR	6
Figura 4. Representação esquemática do ancoramento dos receptores de glicina pela gefirina ao esqueleto celular.	7
<b>MANUSCRITO</b>	
Tabela 1. Energia de interação e distância de resíduos de aminoácidos entre o domínio E da gefirina e a alça $\beta$ do GlyR.	34
Figura 1: Representação da interface entre o domínio E da gefirina e a alça $\beta$ de GlyR.	36
Figura 2: Esquema MFCC contendo os quatro fragmentos distintos considerados neste estudo.	37
Figure 3. Painel BIRD com as interações mais importantes.	38
<b>DISCUSSÃO</b>	
Figura 5. Interações entre os resíduos de aminoácidos Ser403 (GlyR) e Asp729 (gefirina).	40
Figura 6: Interação sigma- $\pi$ entre Phe398 (GlyR) e Arg653 (gefirina).	41
Figura 7: Interação entre Ser399 (GlyR) e Asp327 (gefirina).	42
Figura 8: Interação entre Ile400 (GlyR) e Phe330 (gefirina).	43
Figura 9: Interação entre Ile400 (GlyR) e Tyr673 (gefirina).	44
Figura 10: Interação entre Ile400 (GlyR) e Met326 (gefirina).	45
Figura 11: Interação entre Arg406 (GlyR) e GLN718 (gefirina).	46
Figura 12: Interação entre Gly402 (GlyR) e Asp279 (gefirina).	47



<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
1. Introdução	1
1.1. Sistema Nervoso	1
1.2. Receptor de glicina e a proteína gefirina	2
1.3. Modelagem molecular e bioquímica computacional	8
1.4. Bancos de dados e estrutura de proteínas	15
1.5. Gefirina em sistemas inibitórios e sua importância clínica	15
2. Objetivos	16
3. Manuscrito	17
4. Discussão	39
5. Conclusões	49
6. Referências	50

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Sistema Nervoso

O sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central (SNC), constituído pelo cérebro e medula espinhal, e sistema nervoso periférico, sendo este composto pelo sistema nervoso somático e sistema nervoso visceral. Em âmbito celular, o sistema nervoso é constituído por neurônios e células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e microglia) (Zigmond et al., 2009).

Os neurônios comunicam-se através de geração e propagação de impulsos nervosos e da produção e liberação de moléculas químicas chamadas neurotransmissores, as quais são usadas para amplificar e modular sinais entre dois neurônios, as sinapses, ou entre neurônios e outras células (Dumoulin et al., 1999).

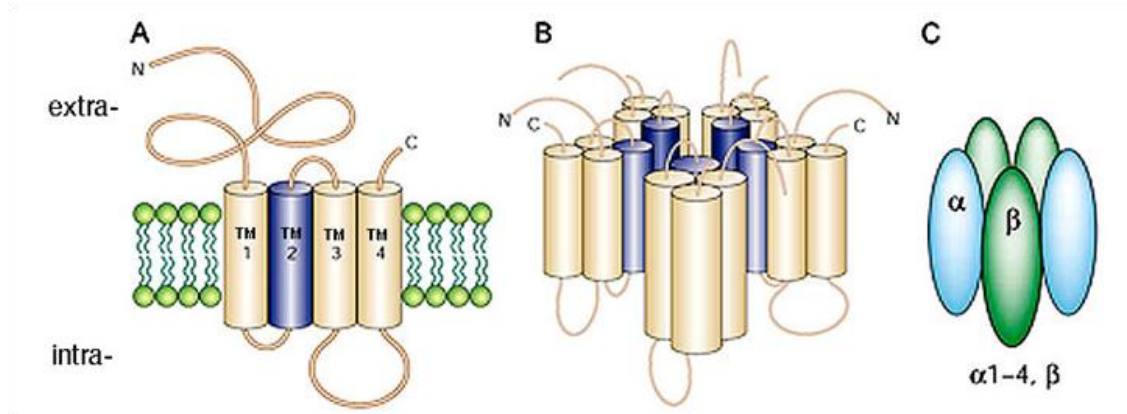
Dentre as principais funções do sistema nervoso está a coordenação da atividade muscular e movimentos de órgãos, assim como a iniciação e finalização de estímulos e ações, devendo sempre existir um equilíbrio entre a transmissão excitatória e inibitória (Siegel et al., 2005). Na transmissão excitatória, podemos destacar os neurotransmissores glutamato e aspartato. Já a transmissão inibitória é mediada, entre outros, pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) e pela glicina, sendo o GABA o principal neurotransmissor inibitório no encéfalo e a glicina, por sua vez, na medula espinhal e tronco cerebral (Siegel et al., 2005).

## 1.2 Receptor de glicina e a proteína gefirina

Os receptores de glicina (GlyR) medeiam a inibição sináptica e localizam-se em sítios pós-sinápticos de forma isolada (Betz, 1991; Triller et al., 1985) ou em sítios mistos, juntamente com receptores GABAérgicos (Dumoulin et al., 2000; Levi et al., 1999). Quando a glicina se liga ao seu receptor, ocorre o rearranjo da estrutura proteica deste receptor ionotrópico com consequente abertura do canal transmembrana (formado pelas cinco subunidades que constituem esta proteína), levando à permeação de íons  $\text{Cl}^-$  através desse canal. Esta ativação do receptor e entrada de  $\text{Cl}^-$  leva à hiperpolarização do neurônio pós-sináptico, conduzindo à ação inibitória no SNC (Young-Pearse et al., 2006).

Estudos mostraram que a alta concentração de receptores  $\text{GABA}_A$  e GlyR na membrana pós-sináptica é extremamente importante para a rápida e precisa transmissão de sinal. A localização correta desses receptores depende da sua ancoragem por uma proteína associada a estes receptores denominada gefirina (Kneussel and Betz, 2000; Legendre, 2001; Moss and Smart, 2001; Sheng and Pak, 2000).

Sabe-se que o receptor de glicina é constituído por subunidades  $\alpha$ , com 48 kDa, e  $\beta$ , com 58 kDa. Estudos recentes sugerem a existência de GlyRs constituídos por duas subunidades  $\alpha$  e três  $\beta$  (Figura 1) (Grudzinska et al., 2005), em detrimento ao que se pensou durante muito tempo, de que tal receptor fosse composto por três subunidades  $\alpha$  e duas  $\beta$  (Kuhse et al., 1993). A principal função da subunidade  $\beta$  é assegurar a interação do receptor da glicina com a gefirina (Meyer et al., 1995).

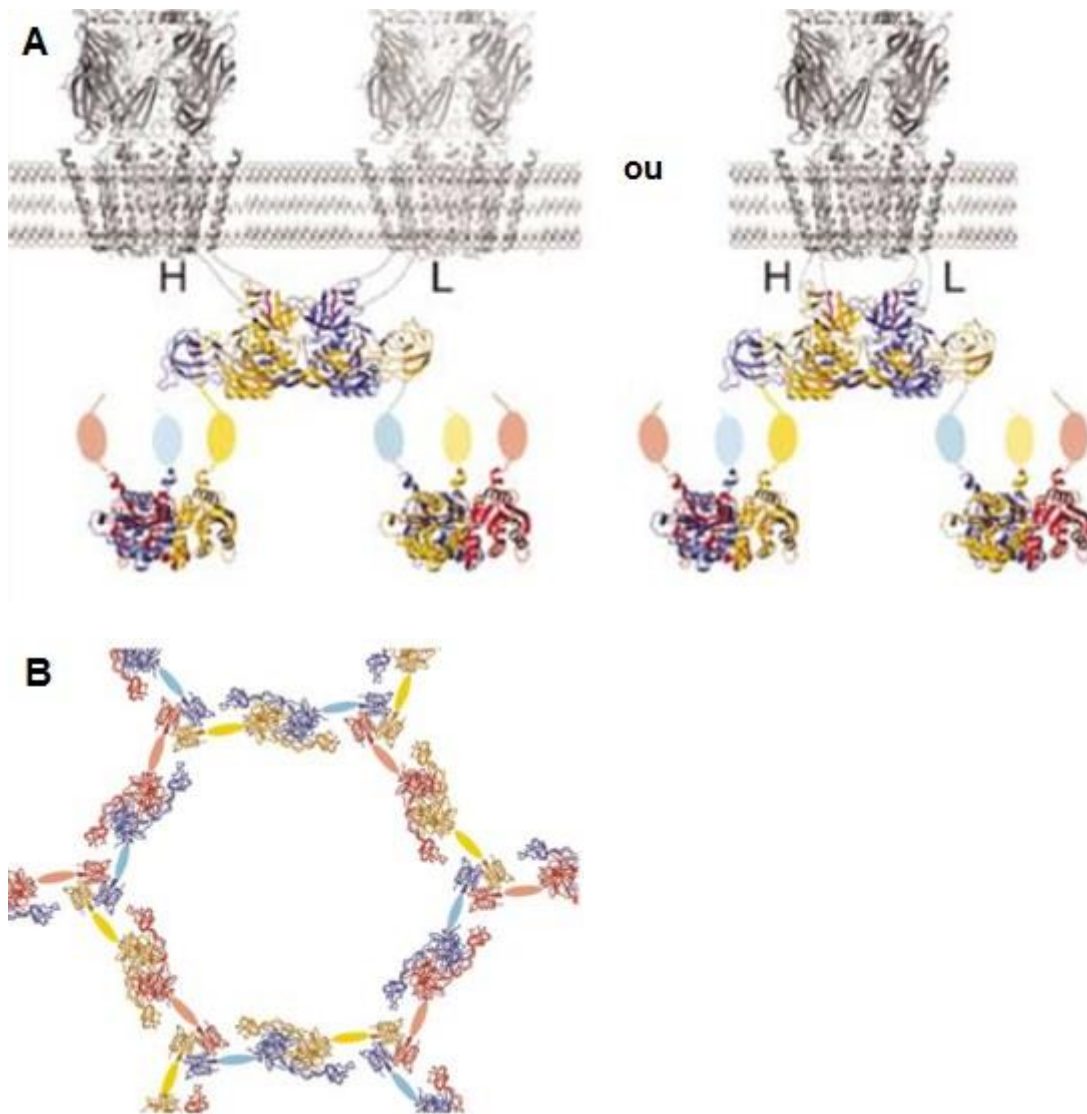


**Figura 1. Estrutura geral do receptor de glicina. (A)** Cada subunidade que compõe o receptor é formada por um grande domínio extracelular N-terminal, quatro domínios transmembrana, uma longa alça intracelular conectando TM3 e TM4 e um pequeno domínio C-terminal extracelular. **(B)** Estrutura do canal iônico presente neste receptor, composto por cinco subunidades. **(C)** Representação esquemática do canal pentamérico constituído por três subunidades  $\alpha$  e por duas subunidades  $\beta$ . (Retirado de Moos e Smart, 2001)

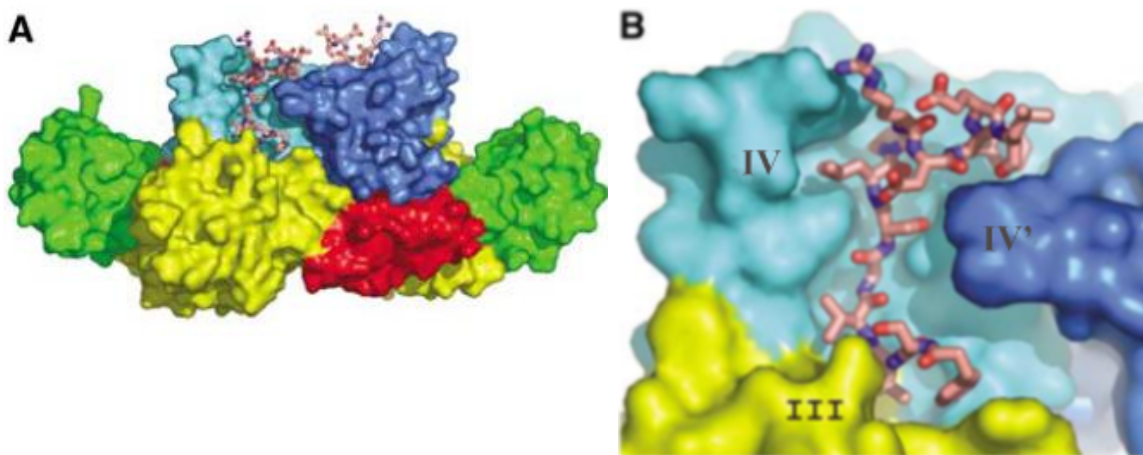
A gefirina, proteína citoplasmática de 93 kDa inicialmente isolada como uma constituinte de preparações purificadas de receptores de glicina, é considerada a proteína estrutural fundamental nas sinapses inibitórias (Pfeiffer et al., 1982; Tyagarajan e Fritschy, 2010). A estrutura da gefirina consiste em três domínios principais, sendo que dois deles são chamados G e E. O domínio N-terminal G, com 20 kDa, e o domínio C-terminal E, com 43 kDa, são ligados por um domínio central C de 18 a 21 kDa. O domínio C serve para unir o G e o E. Os domínios G isolados formam trímeros estáveis, enquanto os domínios E isolados formam dímeros em solução (Tyagarajan and Fritschy, 2010).

Sola e colaboradores (Sola et al., 2004) confirmam os resultados obtidos por Rees e colaboradores (Rees et al., 2003) e por Schrader e colaboradores (Schrader et al., 2004) de que apenas o domínio E da gefirina é suficiente para

que ocorra interação entre este e o GlyR. Além disso, seus dados indicam que a gefirina-E pode se ligar aos peptídeos de duas alças  $\beta$  de GlyR com diferentes afinidades, uma mais forte e outra mais fraca (Figura 2). A interação entre a gefirina e os GlyR na densidade pós-sináptica dá-se através da ligação entre o domínio E da gefirina e a alça citoplasmática localizada entre os segmentos três e quatro da subunidade  $\beta$  (Figura 3) do GlyR (Kim et al., 2006; Tyagarajan and Fritschy, 2010).



**Figura 2. Modelo de formação da rede de ancoramento do receptor de glicina pela gefirina.** **(A)** Os domínios E da gefirina formam dímeros que podem interagir com as alças  $\beta$  de dois GlyRs diferentes (esquerda) ou com duas alças  $\beta$  derivadas do mesmo GlyR (direita). H e L representam as interações com o GlyR de alta e baixa afinidades, respectivamente. **(B)** A dimerização dos domínios E de gefirina podem formar uma rede hexagonal quando vistas de cima. Os domínios G e E são mostrados como fitas, enquanto os domínios intermediários são vistos esquematicamente (Sola et al., 2004).



**Figura 3. Representação da gefirina-E em complexo com a alça  $\beta$  do GlyR.** (A) Estrutura global do complexo. Os subdomínios da gefirina-E (I, II, III e IV de um monômero e I', II', III' do outro monômero) estão coloridos diferentemente, sendo que o subdomínio IV' do segundo monômero está em azul escuro. (B) Vista aproximada do sítio de ligação. A alça  $\beta$  do GlyR está inserida na fenda formada pelos subdomínios III e IV de um monômero e pelo subdomínio IV' de outro monômero (Kim et al., 2006).

Em neurônios, a gefirina é agregada na densidade pós-sináptica, concentrando GlyR e/ou GABA<sub>A</sub>R nesses sítios e estabilizando esses receptores (Fritschy et al., 2008). Estudos realizados com cultura de neurônios da medula espinhal indicam que a gefirina imobiliza e ancora os GlyR ao citoesqueleto sub-sináptico (Figura 4) (Kirsch and Betz, 1995). De fato, os GlyR ligam-se diretamente à proteína gefirina (Meyer et al., 1995) em diferentes compartimentos celulares. Além dos sítios pós-sinápticos, podemos observar essa associação também em vesículas intracelulares (Hanus et al., 2004), onde a gefirina exerce um papel de adaptador de carga e liga o receptor às proteínas motoras dependentes de microtúbulos que proporcionam transporte bidirecional de longas distâncias entre o soma neural e os neuritos (Maas et al., 2009; Maas et al., 2006). O tratamento com alcaloides, os quais alteram a organização de

microtúbulos e microfilamentos de actina, afeta o número e o tamanho de agregados pós-sinápticos de gefirina e GlyR (Kirsch and Betz, 1995).

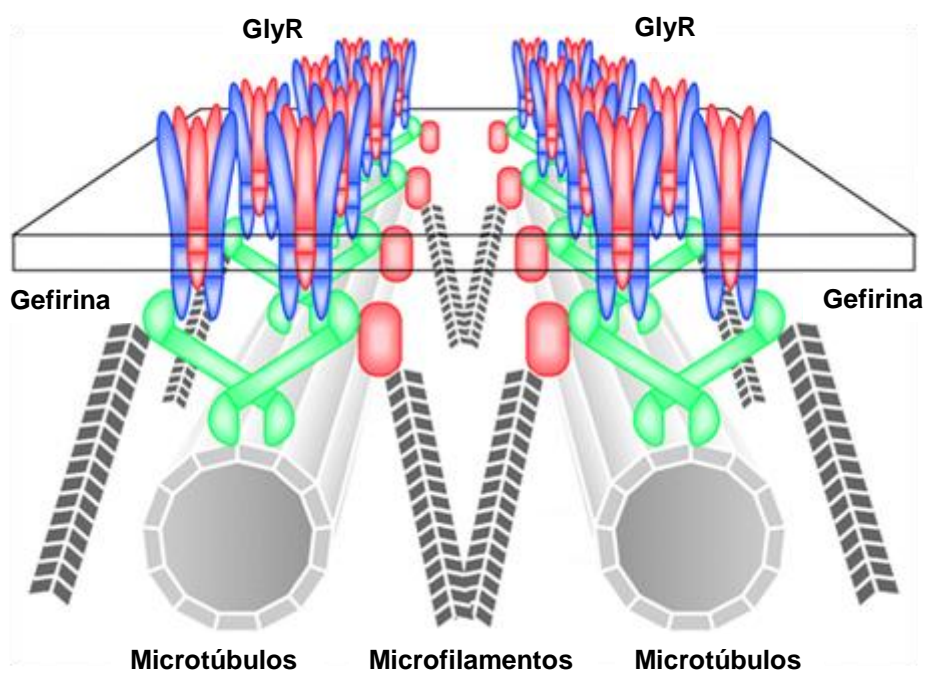


Figura 4. Representação esquemática do ancoramento dos receptores de glicina pela gefirina ao esqueleto celular, conforme Harvey e Betz (2001).

A gefirina está conservada em diversos seres vivos, inclusive em bactérias. A gefirina humana apresenta similaridades com as enzimas bacterianas MoeA e MogA (daí os nomes dos domínios da gefirina humana serem E e G), as quais sintetizam o cofator molibdênio (MoCo). Esse cofator é necessário para a atividade de enzimas como a sulfito oxidase, xantina oxirredutase e aldeído oxidase (Schwarz, 2005; Smolinsky et al., 2008). Em humanos, além de servir como armação ou *scaffold*, a gefirina é responsável pela síntese de MoCo e essa síntese depende de ambos os domínios E e G (Fritschy et al., 2008). Contudo,



mutações na gefirina *full-length* que previnem sua agregação não prejudicam a sua atividade enzimática (Lardi-Studler et al., 2007; Schwarz, 2005).

Ainda não se sabe se a biossíntese de MoCo e o ancoramento e agregação dos GlyR na densidade pós-sináptica dos neurônios inibitórios pela gefirina são duas funções totalmente independentes (Sola et al., 2004), porém a dimerização da gefirina-E parece ser importante tanto para a sua atividade enzimática como para agregar os GlyR (Kneussel and Betz, 2000; Xiang et al., 2001).

### **1.3 Modelagem molecular e bioquímica computacional**

A bioquímica computacional é a ciência de representar estruturas moleculares e simular seu comportamento com as equações da física clássica e quântica. Programas de química computacional permitem aos pesquisadores gerar e apresentar os dados moleculares, incluindo geometrias (comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos de torção), energia (calor de formação, energia de ativação, etc.), propriedades eletrônicas (momento de dipolo, potencial de ionização, afinidade eletrônica), propriedades espectroscópicas (modos de vibração) e outras propriedades (volume, área de superfície, difusão, viscosidade, etc.) (Chen et al., 2005; Cossio et al., 2010; He and Zhang, 2005). Comparações com dados experimentais, quando disponível, também são importantes para orientar tanto o trabalho de laboratório quanto o computacional.

A bioquímica computacional também é uma ferramenta importante para o estudo da interação entre ligantes e receptores (Cossio et al., 2010). Quantificar a energia de interação entre moléculas e suas proteínas-alvo, determinar as relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica, a

proposição de sítios, orientações e conformações de interação de ligantes ainda não co-cristalizados e observar o comportamento dinâmico de moléculas e complexos de interesse farmacológico são algumas das áreas nas quais a modelagem molecular vem contribuindo para a química medicinal e o planejamento de novos fármacos (Chen et al., 2005; Cossio et al., 2010; He and Zhang, 2005).

A modelagem molecular (MM), segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias. Ela compreende um número de ferramentas e métodos computacionais e teóricos que têm como objetivo entender e prever o comportamento de sistemas reais, sendo usada para descrever e prever estruturas moleculares, propriedades do estado de transição e equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, entre outras. Estes métodos abrangem estudos de minimização de energia de moléculas, análise conformacional, simulações de dinâmica molecular entre outros, sendo aplicáveis desde átomos isolados a biomacromoléculas (Chen et al., 2005; Cossio et al., 2010; He e Zhang, 2005; Santos et al., 2007). As técnicas de MM são utilizadas nas áreas de bioquímica computacional, biologia computacional e ciência dos materiais.

A MM é uma ferramenta essencial para a bioquímica computacional, sendo importante tanto para a descoberta de fármacos quanto para o seu desenvolvimento. Os rápidos avanços em *hardware* e *software* computacionais fizeram com que muitas das operações que antes eram de competência

exclusiva do especialista de laboratório pudessem agora ser realizados em computadores. É uma ferramenta importante para o processo de planejamento de fármacos, pois permite a obtenção de informações como as propriedades específicas de um composto que podem influenciar na interação com seu receptor, como por exemplo, o mapa de potencial eletrostático, a densidade eletrônica e as energias dos orbitais de fronteira: orbital molecular ocupado mais alto (HOMO, *highest occupied molecular orbital*) e orbital molecular não ocupado mais baixo (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbital*) (Joshi et al., 2011). Assim, a MM é indispensável não somente no processo de planejamento, mas também na otimização de protótipos já existentes.

O método que deve ser aplicado em determinada abordagem de modelagem molecular deve depender do composto em questão (quantidade e tipo de átomos, tipo de ligações envolvidas) e do custo computacional. Existem muitas opções quanto ao método de cálculo a ser utilizado em uma determinada abordagem da modelagem molecular, e todas elas derivam de três métodos principais: mecânica molecular, semi-empírico e *ab initio* (Joshi et al., 2011). As definições desses termos são úteis para a compreensão do uso de técnicas computacionais para a bioquímica computacional.

O termo *ab initio* em latim significa “desde o início”. Este nome é dado a um grupo de métodos aproximados em que as estruturas moleculares podem ser calculadas usando nada além da equação de Schrödinger, os valores das constantes fundamentais e os números atômicos presentes (Bethanis et al., 2002). Estes métodos derivam diretamente dos princípios teóricos, sem inclusão de dados experimentais. As aproximações geralmente são utilizadas na forma

de funcional, a fim de obter uma solução aproximada da equação diferencial de Schroedinger. Em Física, a Equação de Schrödinger, proposta pelo físico austríaco Erwin Schrödinger em 1925, descreve a evolução temporal do estado quântico de um sistema físico. Essa equação tem uma importância capital na teoria da mecânica quântica e seu papel é similar ao da segunda Lei de Newton na mecânica clássica (MC).

O método mais comum de cálculo *ab initio* é chamado de *Hartree Fock* (HF), o qual fornece uma boa aproximação para a solução da equação de Schrödinger para um sistema de muitos elétrons, que é chamada aproximação de campo central. Isto significa que a repulsão elétron-elétron não é especificamente levada em conta, no entanto, seu efeito líquido é incluído no cálculo como uma interação média do sistema (Bethanis et al., 2002). Este cálculo é chamado de variacional, o que significa que as energias aproximadas calculadas são todas iguais ou maiores do que a energia exata. As energias são geralmente calculadas em unidades chamadas Hartrees ( $1 \text{ Ha} = 27,2114 \text{ eV}$ ) (Liu and Franke, 2002). Por causa da aproximação de campo central, as energias dos cálculos HF são sempre maiores do que a energia exata e tendem a um valor limite denominado limite *Hartree Fock*. A segunda aproximação nos cálculos HF é que a função de onda deve ser descrita por uma forma funcional, o que só é conhecido exatamente por alguns sistemas de um elétron. As funções mais frequentemente usadas são combinações lineares de orbitais do tipo *Slater* (STO) ou orbitais do tipo Gaussianas (GTO). A função de onda é formada a partir de combinações lineares de orbitais atômicos ou mais frequentemente a partir de combinações lineares de funções de base. Devido a essa aproximação, a

maioria dos cálculos HF fornece uma energia maior que o limite Hartree Fock (Liu and Franke, 2002).

Existe uma categoria de cálculos que começam a utilizar métodos perturbativos para a obtenção da repulsão elétron-elétron explícita, referida como a correlação. A ideia central desses métodos é dividir o hamiltoniano em uma parte principal que possui autofunções conhecidas, chamada Hamiltoniano não-perturbado, e uma parte restante, chamada perturbação. Alguns desses métodos são as teorias da perturbação *Mohlar-Plesset* (MPN, onde n é a ordem de correção), o método de ligação de valência generalizada (GVB, *Generalized Valence Bond*), Multi-Configurações de Campo Auto Consistente (MCSCF), Interações de Configurações (IC) e teoria do conglomerado acoplado (CC, *Coupled Cluster*) (Bethanis et al., 2002; Liu and Franke, 2002).

Um método *ab initio* alternativo é a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), em que a energia é expressa em termos da densidade total de elétrons, ao invés da função de onda dos N-elétrons, que é muito mais complexa. Diferentemente de outros métodos, como os métodos semi-empíricos que tentam, tanto quanto possível, se aproximar do método HF, a DFT relaciona-se com a solução exata do problema de muitos elétrons (He and Zhang, 2005). A vantagem dos métodos *ab initio* é que eles eventualmente convergem para a solução exata, uma vez que todas as aproximações são feitas de magnitude suficientemente pequena. A desvantagem dos métodos *ab initio* é que eles frequentemente são dispendiosos em termos computacionais, requerendo uma enorme quantidade de tempo de processamento, memória e espaço em disco. Em geral, dão bons resultados qualitativos e podem dar resultados

quantitativamente mais precisos quando as moléculas em questão se tornam menores (He and Zhang, 2005; Liu and Franke, 2002).

Os métodos semi-empíricos foram criados com a mesma estrutura geral dos métodos HF. Dessa maneira, algumas informações, como duas integrais de elétrons, são aproximadas ou completamente omitidas do Hamiltoniano que descreve o sistema. A fim de corrigir os erros introduzidos pela omissão de alguns termos, o mesmo tem algumas parametrizações, para ajustar a curva que descreve o sistema, alguns parâmetros ou números, a fim de dar o melhor resultado possível quando comparado com dados experimentais (Tellez et al., 2004). A vantagem destes métodos é que eles são muito mais rápidos que os cálculos *ab initio*, mas o seu resultado pode ser menos preciso, porém se a molécula a ser calculada for semelhante às moléculas da base de dados utilizada para parametrizar o método, os resultados podem ser muito bons. Se a molécula a ser calculada é significativamente diferente de qualquer coisa no conjunto de parametrização, as respostas podem ser muito ruins. Esses métodos podem ser muito bem-sucedidos na descrição de moléculas orgânicas, mesmo tendo sido projetados especificamente para a descrição de moléculas inorgânicas.

Se uma molécula é muito grande para usar efetivamente um tratamento semi-empírico, ainda é possível modelar seu comportamento, evitando totalmente a mecânica quântica. Os métodos referidos como Mecânica Molecular fazem uso de uma expressão algébrica simples para a energia total de um composto, sem necessidade de calcular uma função de onda ou uma densidade total de elétrons (Alonso et al., 2008). A expressão da energia consiste em uma equação clássica, como a equação do oscilador harmônico, a

fim de descrever a energia associada com o vínculo de estiramento, flexão, rotação e forças intermoleculares, como as interações de van der Waals e ligações de hidrogênio (Alonso et al., 2008; Tellez et al., 2004). Todos os valores constantes nas equações devem ser obtidos a partir de dados experimentais ou de cálculos *ab initio*. Em mecânica molecular, a base de dados de compostos utilizados para parametrizar o método é o conjunto de parâmetros e funções chamado campo de força e estes são cruciais para uma descrição bem-sucedida. Como um método semi-empírico pode ser parametrizado para um conjunto de moléculas orgânicas, um método de mecânica molecular pode ser parametrizado para uma classe específica de moléculas, como proteínas, por exemplo (Tellez et al., 2004). Tal campo de força só seria esperado ter alguma relevância para descrever outras proteínas. A vantagem da mecânica molecular é que ela permite a modelagem de moléculas grandes, como proteínas e segmentos de DNA, tornando-se a principal ferramenta de bioquímicos computacionais. A desvantagem da mecânica molecular é que existem muitas propriedades químicas que não são ainda definidas dentro do método (Alonso et al., 2008; Tellez et al., 2004). Para trabalhar com sistemas extremamente grandes e complicados, muitas vezes os pacotes de softwares de mecânica molecular são mais poderosos e com interfaces gráficas mais fáceis de usar. Devido a isso, a mecânica molecular é usada muitas vezes porque é fácil, mas não necessariamente uma boa maneira de descrever um sistema.

#### **1.4 Banco de Dados de Estrutura de Proteínas**

Os bancos de dados estruturais são a base da bioquímica molecular, pois fornecem os ingredientes para a predição, a análise e o estudo da estrutura de biomoléculas. O mais conhecido banco de dados de estruturas tridimensionais de proteínas é o PDB (*Protein Data Bank*) (Cossio et al., 2010), o qual tem como principal propósito armazenar, organizar e distribuir estruturas de macromoléculas. O PDB não é o único banco de dados de informações estruturais de proteínas, existem ainda outras bases de dados que organizam e distribuem este tipo de informações. São exemplos destas bases de dados: Laboratório de Biologia Molecular Europeu (EMBL, ***European Molecular Biology Laboratory***), um banco de dados de estruturas de proteínas localizado na Europa e o banco de dados de estruturas localizado no Japão (PDBj, *Protein Data Bank Japan*). A possibilidade de acesso a informações sobre a estrutura de proteínas é uma peça chave no estudo destas biomacromoléculas.

#### **1.5 Gefirina em sistemas inibitórios e sua importância clínica**

Como diferentes doenças neurais apresentam alterações nas vias inibitórias, torna-se fundamental compreender os processos fisiológicos que são relacionados à organização dos receptores e proteínas envolvidas nessas vias. Assim, pode-se alcançar um maior entendimento a respeito das mudanças que medeiam o processo de desenvolvimento e comprometimento neural.



Estudos apresentam evidências de que alterações em sistemas inibitórios podem estar envolvidos em diversas disfunções neurais, inclusive no autismo (Piton et al., 2012; Ramanathan et al., 2004; Gironell et al., 2012).

Sendo a gefirina um importante componente nas sinapses inibitórias, seu envolvimento em distúrbios pode ser considerado óbvio. De fato, muitos trabalhos relacionam a gefirina com várias enfermidades, dentre elas a doença de Alzheimer e a hiperecplexia (Agarwal et al., 2008; Seidahmed et al., 2012).

A hiperecplexia é uma desordem neurológica de origem genética na qual ocorre uma resposta de sobressalto exacerbado após estímulos somatossensoriais, auditivos e visuais inesperados, promovendo espasmos flexores generalizados e hipertonia. A desordem é resultante de neurotransmissão glicinérgica aberrante e foram reportadas várias alterações em genes que codificam as subunidades  $\alpha 1$  e  $\beta$  do GlyR, transportador de glicina GlyT2 e também a gefirina e a colibistina (Seidahmed et al., 2012).

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar a interface de ligação do dímero da gefirina com a alça  $\beta$  do receptor de glicina, a partir de estrutura cristalográfica.

### **Objetivos específicos**

Analisar as similaridades e diferenças entre os dados obtidos no presente estudo e os dados descritos no trabalho que forneceu a estrutura cristalográfica.

Avaliar os resíduos de aminoácidos com maior contribuição energética na ligação.

### **3. MANUSCRITO**

**A QUANTUM DESCRIPTION OF THE STRUCTURAL ENERGY IN THE  
GLYCINE RECEPTOR ANCHORING BY GEPHYRIN**

Alessandro Witczak<sup>1 \*</sup>, Geancarlo Zanatta<sup>1 \* #</sup>, Victorio Bambini-Junior<sup>1</sup>,  
Ewerton W.S. Caetano<sup>2</sup>, Valder N. Freire<sup>3</sup>, Carmem Gottfried<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Institute of Health's Basic Science, Federal  
University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Federal Institute for Education, Science and Technology of Ceará, Fortaleza,  
CE, Brazil

<sup>3</sup>Department of Physics, Center of Sciences, Federal University of Ceará,  
Fortaleza, CE, Brazil

\*Both authors contributed equally to this work.

**#CORRESPONDENCE ADDRESS:**

Geancarlo Zanatta

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo

90035 - 003 - Porto Alegre, RS - BRAZIL

Fax: +55 51 3308 5540 Phone: +55 51 3308 5565

E-mail: geancarlo.zanatta@gmail.com

**Highlights:**

We studied the interaction between domains E of gephyrin with the loop  $\beta$  of GlyR.

DFT method was used to describe the anchoring of  $\beta$ -loop GlyR by gephyrin subunit-E.

The main attractive contribution was  $-32.09 \text{ kcal mol}^{-1}$  from two hydrogen bonds between Asp729 (gephyrin) and Ser403 (GlyR).

The second largest contribution was  $-24.04 \text{ kcal mol}^{-1}$ , a sigma-pi interaction between Arg653 (gephyrin) and Phe398 (GlyR).

The sum of individual contributions indicate a total binding energy of  $-343.49 \text{ kcal/mol}$ .

This work is relevant to the understanding of structural analysis of the GlyR and its alterations under pathological conditions.

## ABSTRACT

Gephyrin consists of three major domains named G, E and C. The interaction between gephyrin and the GlyR involves the E-domain of gephyrin and a cytoplasmic loop located between transmembrane segments three and four of the GlyR beta subunit. Combined quantum-mechanics and molecular-mechanics in the gephyrin-GlyR association studies increase the understanding of atomic detail. In order to investigate electronic features in the mechanisms of the GlyR anchoring by gephyrin we have employed theoretical approaches of quantum biochemistry. The energy contribution of each individual amino acid residues within the molecular interface of the anchorage between gephyrin and GlyR were evaluated. The largest contributions in the analysis of 34 interactions were, in descending order:  $-32.09 \text{ kcal mol}^{-1}$ , observed between residues Asp729 (gephyrin) and Ser403 (GlyR);  $-24.04 \text{ kcal mol}^{-1}$  between Arg653 (gephyrin) and Phe398 (GlyR) and  $-23.50 \text{ kcal mol}^{-1}$  between Asp327 (gephyrin) and Ser399 (GlyR). The smaller interaction was  $-1.78 \text{ kcal mol}^{-1}$  between the amino acid residues Ile656 (gephyrin) and Ser399 (GlyR). All interactions observed in this study showed attractive interaction, and the sum of individual contributions indicate a total binding energy of  $-343.49 \text{ kcal/mol}$ . After the analysis of individual residue contribution we could determine the relevance of Asp729 (gephyrin) / Ser403 (GlyR), followed by Arg653 (gephyrin) / Phe398 (GlyR), Asp327 (gephyrin)/ Ser399 (GlyR) and Phe330 (gephyrin) / Ile400 (GlyR), among others. These results contribute to the understanding of the molecular mechanisms involved in the stabilization/disruption of GlyR in the synaptic membrane.

## INTRODUCTION

Glycine receptor (GlyR) is a member of the ligand-gated ion channel superfamily and is the major inhibitory neurotransmitter receptor in the spinal cord and brain stem (Betz et al., 1993). Its activation through the binding of glycine allows the ion channel opening and Cl<sup>-</sup> flux across the synaptic membrane, modulating the inhibitory signal. GlyR acts either through individual localization in the post-synaptic cleft (Betz, 1991; Triller et al., 1985) or in the presence of GABA receptors (Dumoulin et al., 2000; Levi et al., 1999). In this way, it is known that a high concentration of  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor (GABA<sub>A</sub>R) and GlyRs are required at the postsynaptic membrane for a fast and precise signal transmission, and this process is dependent of the presence of the receptor-associated scaffolding protein gephyrin (Tretter et al., 2012).

Gephyrin consists of three major domains named G, E (due to sequence similarities with the bacterial Moco-synthesizing enzymes MogA and MoeA) and C (central). The 20 kDa N-terminal G domain and the 43 kDa C-terminal E domain are linked by a central domain (C domain) of 18–21 kDa. The G domain forms trimers and E domain forms dimers in solution and presents the high-affinity binding site for the M3-M4 intracellular loop of the GlyR  $\beta$  subunit ( $\beta$  loop) (Fritschy et al., 2008). The binding of E domain with GlyR  $\beta$  loop at the dimerization interface, observed by crystal structure, interacts with residues F330, Y673 and P713 being crucial for the formation of a high-affinity binding site (Kim et al., 2006).

Gephyrin is involved in clustering of glycine- and GABA<sub>A</sub> receptors, stabilizing them at inhibitory synapses (Fritschy et al., 2008). The role of gephyrin in

GABAergic synapses, the nature of its interactions with GABA<sub>A</sub> receptors, and the mechanisms of targeting to GABAergic synapses are not well understood. The demonstration that the intracellular gephyrin/GlyR complexes are able to increase the cell surface accumulation of GlyR (Hanus et al., 2004) reinforces the idea that gephyrin plays a central role for the aggregation of GlyR. In addition, presynaptic input plays a determinant role on the clustering of gephyrin and GABA<sub>A</sub> receptors during the initial stages of synapse formation (Studler et al., 2005).

Gephyrin is also present in the intracellular space, traveling in the cytoplasm along microtubules together with GlyR transport vesicles (Hanus et al., 2004). The intracellular GlyR–gephyrin colocalization indicates that gephyrin may associate with GlyR along the secretion pathway (Maas et al., 2009; Maas et al., 2006). The interaction between gephyrin and the GlyR involves the E-domain of gephyrin and a cytoplasmic loop located between transmembrane segments three and four of the GlyR beta subunit (Kim et al., 2006).

Combined quantum-mechanics, a sophisticated *ab initio* method and molecular-mechanics in the gephyrin-GlyR association studies will increase the understanding of atomic detail, opening new avenues for studying questions that cannot be resolved with either standard quantum chemical or traditional force-field methods. In order to investigate electronic features in the mechanisms of the GlyR anchoring by gephyrin we have employed theoretical approaches of quantum biochemistry. These methods have been used in our group to study the energies involved in many biological systems, as the energy of binding in the complex aspirin/COX-1 (Barroso-Neto et al., 2012), the

interactions of statin drugs in the HMG-CoA reductase binding site (da Costa et al., 2012) and the interactions of the antipsychotic eticlopride with the amino acid residues in the dopamine D3 receptor binding pocket (Zanatta et al., 2012). The use of quantum methods simulations, commonly applied in chemistry, to investigate biological systems at the molecular level is promising. However, the computational cost due to the huge number of electrons involved is very high. One way to overcome this difficulty is to describe the system by using the electronic density  $\rho(r)$ , which depends on three space coordinates only, instead of the wave function, which changes on the  $3N$  space coordinates ( $N$  being the number of electrons). Such is the essential feature of Density Functional Theory (DFT), where the total energy of a multielectronic system is expressed as a functional of the electron charge density, which is found after solving the Kohn-Sham equations (Hohenberg and Kohn, 1964; Kohn and Sham, 1965). Another useful approach to allow the calculations at the quantum level for large molecules or molecular systems is to divide them into smaller fragments (Gordon et al., 2011). The Molecular Fractionation with Conjugate Caps (MFCC) method, in particular, provides a simple way to estimate interaction energies for protein-ligand systems, where the amino acid residues are capped with portions of their molecular neighborhood to preserve their local electronic environment (Chen et al., 2005; Gao et al., 2004; Gordon et al., 2011; He and Zhang, 2005; Zhang and Zhang, 2003).

In the present study, we have analyzed the energy contribution of each individual amino acid residues within the molecular interface of the anchorage between gephyrin and GlyR.



## **MATERIAL AND METHODS**

### **Structural data**

Crystallographic data of gephyrin complexed with a GlyR was obtained from Protein Data Bank (PDB ID: 2FTS). This structural data contains the cocrystal of the GlyR  $\beta$ -loop complexed with gephyrin's E-domain dimer, at resolution of 2.4 Å (Kim et al., 2006). Analysis were performed using softwares Accelrys Materials Studio 5.5, Accelrys Discovery Studio 2.5 and images created using Pymol (Schrodinger, 2010).

### **Classical and DFT calculations**

Before DFT calculations, the hydrogen atoms were add to the structures an its positions optimized through classical energy minimization steps through the Forcite code using COMPASS forcefield (Sun, 1998; Sun et al., 1998) with convergence tolerances set to  $2.0 \times 10^{-5}$  kcal mol<sup>-1</sup> (total energy variation), 0.001 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup> (maximum force per atom) and  $1.0 \times 10^{-5}$  Å (maximum atomic displacement). All non-hydrogen atoms were kept under constrain during the energy minimization procedure. Afterwards, calculations at the DFT level using the DMOL3 code (Delley, 1990; Delley, 2000) were performed adopting the Local Density Approximation (LDA) with the PWC (Perdew and Wang, 1992). A Double Numerical plus Polarization (DNP) basis set was chosen to expand the Kohn-Sham orbitals for all electrons. The total energy variation, which specifies the self-consistent field (SCF) convergence threshold, was set to  $10^{-6}$  Ha, which is more than enough to reach a well converged electronic structure.

### **Molecular Fractionation with Conjugate Caps (MFCC)**

The MFCC scheme is pivotal to accurately describe large biological systems using quantum calculations (Barroso-Neto et al., 2012; Chen et al., 2005; da Costa et al., 2012; Gao et al., 2004; Gordon et al., 2011; He and Zhang, 2005; Zanatta et al., 2012; Zhang and Zhang, 2003), where pairs of conjugate molecular caps are inserted at the cuts to satisfy the valence of the fragments, allowing the evaluation of the protein interaction energy at a given structure with another molecule. It can be obtained by quantum mechanical calculation of interaction energies between the molecule and individual protein fragments and their conjugate caps (Zhang et al., 2003).

### **The BIRD Panel**

The BIRD (an acronym for Binding site, Interaction energy and Residues Domain) panel aims to show clearly: (i) the interaction energy (in kcal mol<sup>-1</sup>) between close residues at the interface of GlyR  $\beta$ -loop and gephyrin's E-domain, from which one can evaluate visually in the horizontal bars the relevance of each residue, whether attracting or repelling each other; (ii) the most important residues contributing to the anchorage interaction, which are shown in the column of residues in the left and right sides. The total binding energy is obtained by adding up the individual contribution of each residue at the interface.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The protein gephyrin has been evaluated by biochemical studies using full-length polypeptide and also individual domains, enabling highly purification preparations of both G and E domains. The present work studied the interaction between two domains E of gephyrin with the loop  $\beta$  of GlyR, obtained by

crystallographic structure (Kim et al., 2006). This interface involves 13 amino acid residues of the handle  $\beta$  GlyR with the protein gephyrin at the resolution of 2.4 Å (PDB: 2FTS). The crystallographic structure containing in the cocrystal of the GlyR  $\beta$ -loop complexed with gephyrin's E-domain demonstrates the main elements which participate in the interface between these two proteins and was reproduced by computational programs as illustrated in Figure 1. This image shows the dimer interface of gephyrin's E-domains complexed with GlyR  $\beta$ -loop. From the information obtained in Figure 1, the protein structures of GlyR  $\beta$ -loop complexed with gephyrin's E-domain were fractionated and the individual contribution of each amino acid residue at their interface were studied through quantum methods.

To investigate the energy involved in the anchorage of GlyR by gephyrin we delimited the number of amino acid residues analyzed through a 5 Å radius cut-off from every contact point in the interface of the GlyR  $\beta$ -loop and gephyrin's

E-domain. For each set of amino acid residues we have formed capped fragments, including disulfide concaps when necessary, as follow: the  $i$ -th amino acid residue of GlyR  $\beta$ -loop is named as  $A^i$  and the  $i$ -th amino acid residue of gephyrin interacting with  $A^i$  as  $B^i$ . The  $A^{i-1}$  ( $A^{i+1}$ ) cap is the residue covalently bound to the amine (carboxyl) group of  $A^i$ , while the  $B^{i-1}$  ( $B^{i+1}$ ) cap is the residue covalently bound to the amine (carboxyl) group of  $B^i$  in the protein. The hydrogen atoms were added in the fragments, if necessary, for passivation of the dangling bonds. A schematic representation of MFCC is showed in Figure 2. The interaction energy between each amino acid residue  $A^i$  and each amino

acid residue  $B^i$ ,  $E(A^i - B^i)$ , was then calculated according to:  $E(A^i - B^i) = E(A^{i-1}A^iA^{i+1} + B^{i-1}B^iB^{i+1}) - E(A^{i-1}A^{i+1} + B^{i-1}B^{i+1}) - E(A^{i-1}A^iA^{i+1} + B^{i-1}B^{i+1}) + E(A^{i-1}A^{i+1} + B^{i-1}B^{i+1})$  (1).

At the right side of Eq. (1), the first term  $E(A^{i-1}A^iA^{i+1} + B^{i-1}B^iB^{i+1})$  is the total energy of the system formed by the amino acid residues at the interface of both proteins and their capped residues; the second term,  $E(A^{i-1}A^{i+1} + B^{i-1}B^{i+1})$ , gives the total energy of the GlyR  $\beta$ -loop's capped residues alone and amino acid residue with caps of GlyR, while the third term,  $E(A^{i-1}A^iA^{i+1} + B^{i-1}B^{i+1})$  is the total energy of the system formed by GlyR  $\beta$ -loop's amino acid residue with its caps and the set of capped residues of GlyR; finally,  $E(A^{i-1}A^{i+1} + B^{i-1}B^{i+1})$  is the total energy of the system formed by the isolated caps.

The total protein-protein energy of interaction was calculated by the sum of individual contributions of amino acid residues at the interface and represents 343.49 kcal mol<sup>-1</sup>. A description of the individual energies of contribution, expressed in kcal mol<sup>-1</sup>, and the minima distance between residues at the interface of complex are showed in Table 1. The greatest contributions observed in the analysis of 34 interactions were: -32.09 kcal mol<sup>-1</sup>, observed between residues Asp729 (gephyrin) and Ser403 (GlyR), followed by -24.04 kcal mol<sup>-1</sup> between Arg653 (gephyrin) and Phe398 (GlyR) and -23.50 kcal mol<sup>-1</sup> between Asp327 (gephyrin) and Ser399 (GlyR). The smaller interaction was -1.78 kcal mol<sup>-1</sup> between the amino acid residues Ile656 (gephyrin) and Ser399 (GlyR).

As indicated in the crystallographic data, water molecules influence the stabilization of interactions on the interface of GlyR and gephyrin complex. In

some cases a water molecule interacts directly with an amino acid side chain, as observed in Asp327 (gephyrin) and Ser399 (GlyR), or Tyr673 (gephyrin) and Val401 (GlyR). In these examples, water molecules affect the relative interactions between amino acid residues forming hydrogen bonds, contributing to the stability of the complex in the region.

The main attractive contributions include (a)  $-32.09 \text{ kcal mol}^{-1}$ , from two hydrogen bonds between Asp729 (gephyrin) and Ser403 (GlyR). This interaction involves the hydroxyl group of the Ser403 side chain and the amide group in the backbone with Asp729 side chain. According to results published by Kim and colleagues (Kim et al., 2006), in a study using mutations of the gephyrin E-domain and GlyR, the lack of such hydrogen bonds, in the case of Asp729-Ser403, is not enough to disrupt the protein-protein complex.

(b)  $-24.04 \text{ kcal mol}^{-1}$ , a sigma-pi interaction between Arg653 (gephyrin) and Phe398 (GlyR). Arg563, Ile656 and Gln683 were not reported as key residues. So, it is probable that, besides the strong interaction between Asp729-Ser403 and Arg653-Phe398, the stability of the complex depends on the set of interactions in other contact points at the interface.

Among the most important interactions to the stability of the complex, the attractive interaction of Asp327 with Ser399 and Ile400 represents  $-36.24 \text{ kcal mol}^{-1}$ . The stronger interaction is  $-23.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ , between Asp327 (gephyrin) and Ser399 (GlyR), which involves water molecules located between these residues. Asp327 (gephyrin) and Ile400 (GlyR) interact through  $-12.74 \text{ kcal mol}^{-1}$ . In the interface of the complex, the hydrophobic interactions are very important to the stability, as observed between

Phe330 (gephyrin) and Ile400 (GlyR) with energy of  $-16.51 \text{ kcal mol}^{-1}$ , and between Met326 (gephyrin) and Ile400 (GlyR). The first was described by Kim and colleagues (2006) as pivot to the complex GlyR-gephyrin, while the second was not valorized. Another interaction poorly mentioned in the literature is that between Asp729 (gephyrin) and Gly402 (GlyR). According to our results, Met326 (gephyrin) and Ile400 (GlyR) interact with an attractive energy of  $-14.44 \text{ kcal mol}^{-1}$ . In the same way, Asp729 (gephyrin) which interacts with Gly402 (GlyR) through  $-13.69 \text{ kcal mol}^{-1}$  also interacts with other neighbor residues, demonstrating that interactions involving these residues might play important roles in the stability of the complex and deserve further investigation.

Among the interactions studied, the most representative are depicted in figure 3, the BIRD panel, where the energy of interaction between the individual sets of amino acid residues from both proteins is represented in horizontal bars. As we can see, only attractive interactions were observed.

It is important to keep in mind that, as the amino acid residue previous to Phe398 was not elucidated in the crystallographic data, it was necessary to add a hydrogen atom, instead of a cap residue, at the amino terminal portion in order to passivate the broken peptide bond. For this reason, interpretations of all interaction energies involving Phe398 should be treated with caution, as a distinct treatment was employed to this residue.

## **CONCLUSION**

In this study, we employed a quantum tool through DFT method to describe the anchoring of  $\beta$ -loop GlyR by gephyrin subunit-E to clarify molecular

mechanisms involved in the stabilization/disruption of GlyR at the synaptic membrane. All interactions observed in this study showed attractive interaction, and the sum of individual contributions indicate a total binding energy of -343.49 kcal/mol. Through the analysis of individual residue contribution we could determine the relevance of Asp729 (gephyrin) / Ser403 (GlyR), followed by Arg653 (gephyrin) / Phe398 (GlyR), Asp327 (gephyrin) / Ser399 (GlyR) and Phe330 (gephyrin) / Ile400 (GlyR), among others. In summary, the present study contributes to the understanding of individual interactions at the interface of the gephyrin and GlyR complex, and is valuable to further structural analysis of the GlyR, as well as its interaction with gephyrin under pathological conditions.

## **ACNOWKEDGMENTS**

The authors acknowledge the Brazilian National Research Council (CNPq). V.N.F. received financial support during the development of this work from the Brazilian Research Agency CNPq-INCT-Nano(Bio)Simes, project 573925/2008-9. E.W.S.C. received financial support from CNPq projects 304338/2007-9 and 482051/2007-8. C.G. received financial support from CNPq project 478916/2010-8.

## **REFERENCES**

Barroso-Neto, I. L., et al., 2012. Inactivation of Ovine Cyclooxygenase-1 by Bromoaspirin and Aspirin: A Quantum Chemistry Description. The Journal of Physical Chemistry B. 116, 3270-3279.

- Betz, H., 1991. Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends Neurosci.* 14, 458-61.
- Betz, H., et al., 1993. Structure and biology of inhibitory glycine receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 707, 109-15.
- Chen, X., et al., 2005. An efficient approach for ab initio energy calculation of biopolymers. *The Journal of Chemical Physics.* 122, 184105.
- da Costa, R. F., et al., 2012. Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations. *Physical Chemistry Chemical Physics.* 14, 1389-1398.
- Delley, B., 1990. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. *The Journal of Chemical Physics.* 92, 508-517.
- Delley, B., 2000. From molecules to solids with the DMol<sup>3</sup> approach. *The Journal of Chemical Physics.* 113, 7756-7764.
- Dumoulin, A., et al., 2000. Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. *Eur J Neurosci.* 12, 3883-92.
- Fritschy, J. M., et al., 2008. Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends Neurosci.* 31, 257-64.
- Gao, A. M., et al., 2004. An efficient linear scaling method for ab initio calculation of electron density of proteins. *Chemical Physics Letters.* 394, 293-297.
- Gordon, M. S., et al., 2011. Fragmentation Methods: A Route to Accurate Calculations on Large Systems. *Chemical Reviews.* 112, 632-672.



Hanus, C., et al., 2004. Intracellular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate. *J Neurosci.* 24, 1119-28.

He, X., Zhang, J. Z. H., 2005. A new method for direct calculation of total energy of protein. *The Journal of Chemical Physics.* 122, 031103-4.

Hohenberg, P., Kohn, W., 1964. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review.* 136, B864.

Kim, E. Y., et al., 2006. Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin. *EMBO J.* 25, 1385-1395.

Kohn, W., Sham, L. J., 1965. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review.* 140, A1133.

Levi, S., et al., 1999. Synaptic control of glycine and GABA(A) receptors and gephyrin expression in cultured motoneurons. *J Neurosci.* 19, 7434-49.

Maas, C., et al., 2009. Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 8731-6.

Maas, C., et al., 2006. Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J Cell Biol.* 172, 441-51.

Perdew, J. P., Wang, Y., 1992. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. *Physical Review B.* 45, 13244-13249.

Schrodinger, LLC, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. 2010.

- Studler, B., et al., 2005. Differential regulation of GABA(A) receptor and gephyrin postsynaptic clustering in immature hippocampal neuronal cultures. *J Comp Neurol.* 484, 344-55.
- Sun, H., 1998. COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *The Journal of Physical Chemistry B.* 102, 7338-7364.
- Sun, H., et al., 1998. The COMPASS force field: parameterization and validation for phosphazenes. *Computational and Theoretical Polymer Science.* 8, 229-246.
- Tretter, V., et al., 2012. Gephyrin, the enigmatic organizer at GABAergic synapses. *Front Cell Neurosci.* 6, 23.
- Triller, A., et al., 1985. Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study. *J Cell Biol.* 101, 683-8.
- Zanatta, G., et al., 2012. Quantum Biochemistry Description of the Human Dopamine D3 Receptor in Complex with the Selective Antagonist Eticlopride. *Proteomics & Bioinformatics.* 5, 155-162.
- Zhang, D. W., et al., 2003. Molecular caps for full quantum mechanical computation of peptide-water interaction energy. *J Comput Chem.* 24, 1846-52.
- Zhang, D. W., Zhang, J. Z. H., 2003. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein--molecule interaction energy. *The Journal of Chemical Physics.* 119, 3599-3605.

Table1. Interaction energy and amino acid residues' distance between gephyrin's E -domain and GlyR  $\beta$ -loop.

Gephyrin	GlyR	E (kcal mol <sup>-1</sup> )	Distance (Å)	Gephyrin	GlyR	E (kcal mol <sup>-1</sup> )	Distance (Å)
Arg653	Phe398	-24.04	2.707	Phe330	Ile400	-16.51	1.935
Asp327	Ile400	-12.74	2.086		Phe398	-6.45	2.534
Asp327(H <sub>2</sub> O)	Ser399	-23.50	2.021	Pro654	Phe398	-5.91	2.201
Asp729	Gly402	-13.69	2.587	Pro671	Val401	-7.01	1.947
	Ser403	-32.09	1.855	Pro713	Gly402	-6.75	2.582
Gln718	Arg406	-14.30	1.965		Leu404	-10.71	2.235
Glu726	Pro405	-10.24	2.590		Ser403	-2.87	2.974
Ile656	Phe398	-6.40	2.186	Pro714	Val401	-5.33	2.527
	Ser399	-1.78	2.865	Thr716	Leu404	-5.80	2.215
Leu637	Ile400	-4.68	2.785	Tyr673	Ile400	-16.06	1.589
Leu722	Pro405	-7.23	2.404	Tyr673(H <sub>2</sub> O)	Val401	-12.24	2.303
Lys658	Phe408	-9.62	2.097	Tyr719	Arg406	-10.91	2.287
	Ser403	-3.40	2.457		Leu404	-11.29	2.711
Met326	Ile400	-14.44	1.958		Pro405	-6.94	2.227
	Val401	-6.58	2.581	Val727	Phe408	-10.92	2.962
Met711	Gly402	-8.79	2.256		Pro405	-5.47	2.875
	Ile400	-6.52	2.520	Val728	Pro405	-2.26	2.801

The energy was calculated through DFT method using LDA-PWC. Distance represents the measuring between the closest atoms of both amino acid residues.

## Legends of Figures

**Figure 1. Representation of the interface between gephyrin's E-domain and GlyR  $\beta$ -loop.** Crystallographic data from PDB ID: 2FTS. Gephyrin's E-domains in gray, GlyR  $\beta$ -loop showed in sticks and residues labeled.

**Figure 2: MFCC scheme showing the four distinct fragments considered in the present study.** (A) GlyR  $\beta$ -loop amino acid residue plus gephyrin amino acid residue with conjugated caps in both structures; (B) GlyR  $\beta$ -loop amino acid residue with conjugated caps plus caps of gephyrin amino acid residue; (C) caps of GlyR  $\beta$ -loop amino acid residue plus gephyrin amino acid residue with conjugated caps; (D) conjugated caps only.

**Figure 3. BIRD panel showing the most important interactions.** Pairwise comparison of amino acid residues interactions are represented by gephyrin's amino acid residues in the left side of the panel and GlyR's amino acid residues in the right side.

Figure 1

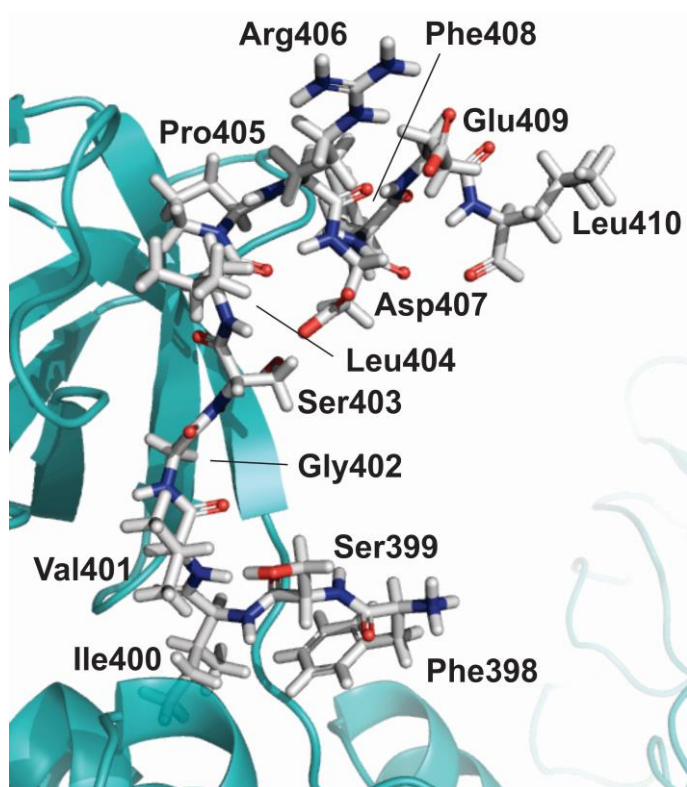


Figure 2

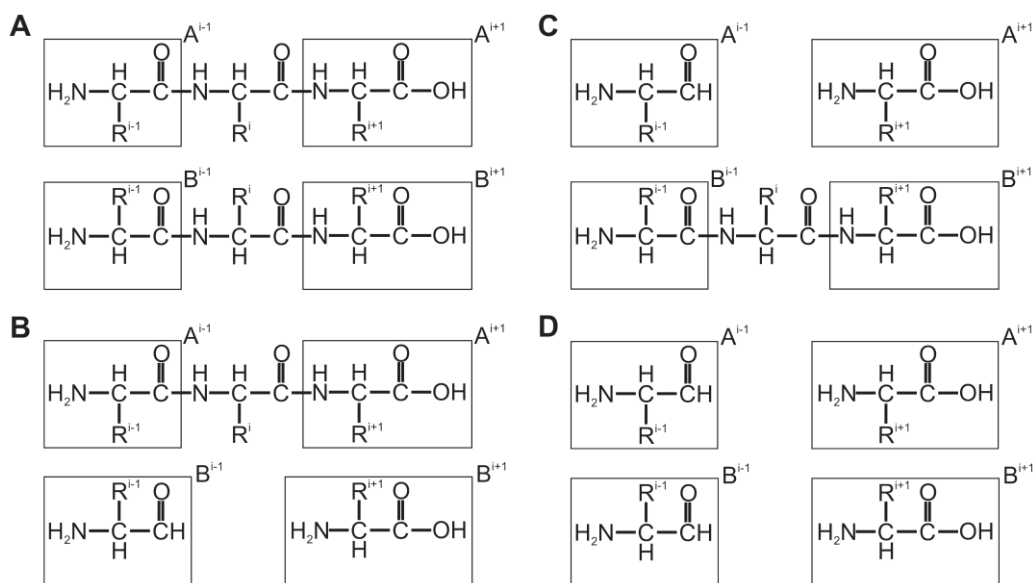
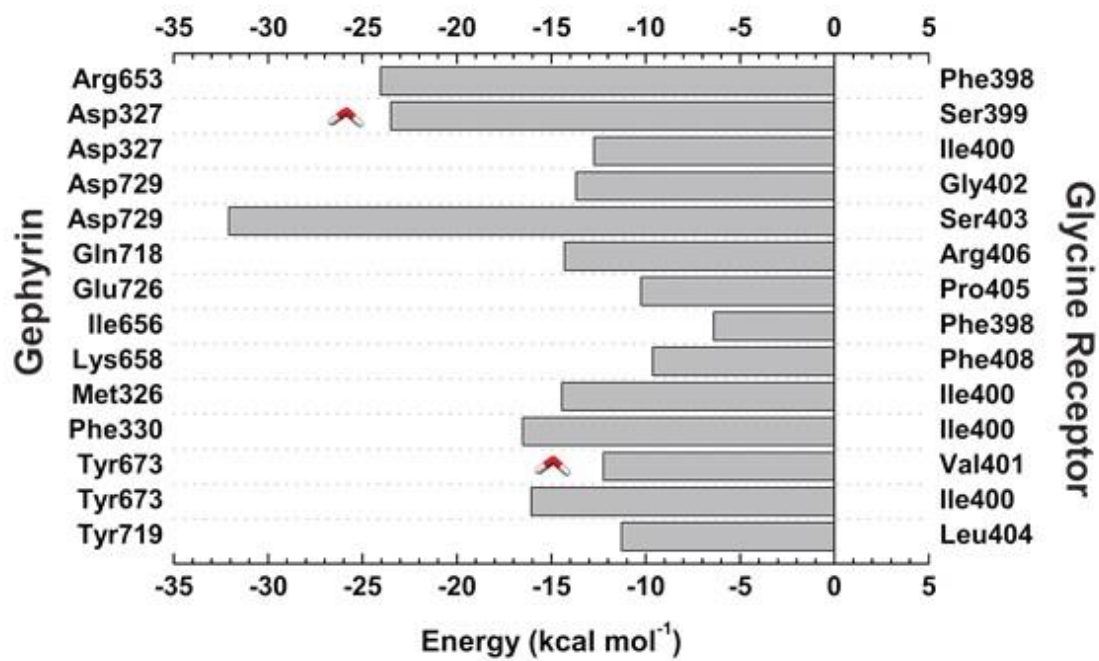


Figure 3



#### 4. DISCUSSÃO

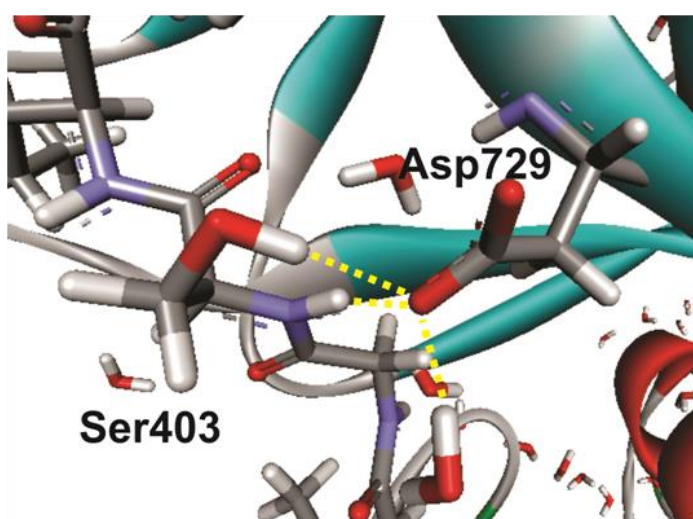
A base do presente trabalho está no estudo da estrutura cristalográfica do dímero formado por dois domínios E da gefirina de rato ligado a treze resíduos de aminoácidos que formam a região de interface da alça  $\beta$  do receptor de glicina com a proteína gefirina, na resolução de 2,4 Å (PDB: 2FTS). Esta estrutura cristalográfica foi elucidada por Kim e colaboradores (Kim et al., 2006) em um trabalho onde são indicados os principais elementos que participam da interface entre estas duas proteínas e, portanto, responsáveis pelo ancoramento da gefirina no receptor de glicina.

No presente trabalho, buscando-se a melhor compreensão desta relação estrutural e o detalhamento dos principais resíduos de aminoácidos envolvidos na interação entre estas duas unidades, foram utilizadas ferramentas de bioquímica quântica para medir a energia relativa de interação entre os pares de resíduos de aminoácido na interface do complexo. Assim, inicialmente descrevemos as similaridades e diferenças entre os dados obtidos no presente estudo e os dados descritos no trabalho que forneceu a estrutura cristalográfica e destacamos os resíduos de aminoácidos com maior contribuição energética.

Considerando as 34 interações existentes entre a gefirina e o GlyR estudadas, demonstramos que a mais representativa foi a interação existente entre os resíduos Asp729 da gefirina e Ser403 do GlyR ( $E = -32,09 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Este fenômeno é explicado pela presença de duas interações de hidrogênio, uma envolvendo o grupamento hidroxila (-OH) da cadeia lateral da Ser403 e outra envolvendo a amida localizada na cadeia principal desse mesmo resíduo (Figura 5). Apesar do alto valor energético envolvido nessa interação, obtido por ensaios



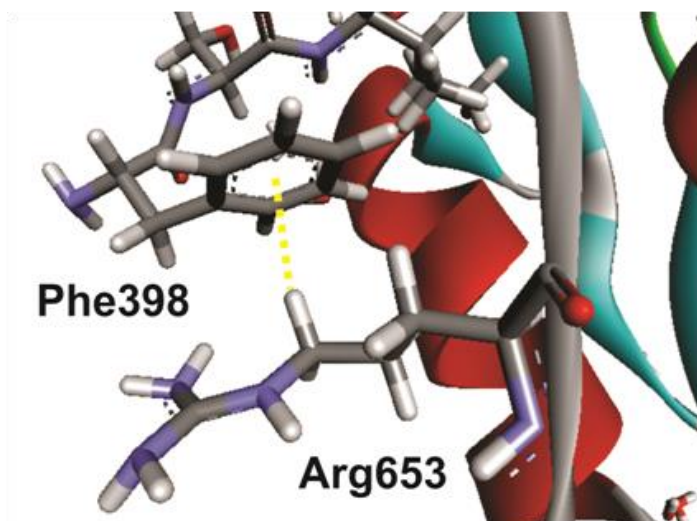
de ligação *in vitro* (mutagênese dirigida) com variantes da gefirina-E e da alça  $\beta$  do GlyR, demonstrou-se que as interações de hidrogênio são dispensáveis, visto que mutações neste ponto não afetaram a ligação entre as moléculas (Kim et al., 2006). Juntos, estes resultados sugerem que a totalidade de interações na interface é forte e distribuída o suficiente para manter a coesão entre a gefirina e o receptor de glicina mesmo na ausência da forte interação entre Ser403 e Asp729.



**Figura 5: Interações entre os resíduos de aminoácidos Ser403 (GlyR) e Asp729 (gefirina).** Em linhas amarelas estão representadas interações de hidrogênio entre o grupo carboxílico do resíduo Asp 729 com uma molécula de água, bem como com os grupos hidroxila da cadeia lateral do resíduo Ser403 e um hidrogênio da ligação peptídica da cadeia do receptor de glicina.

A segunda maior energia de ligação ocorre entre Arg653 (gefirina) e Phe398 (GlyR) com um valor de  $-24,04 \text{ kcal mol}^{-1}$ , onde a cadeia lateral do primeiro está paralela ao anel aromático do segundo. Porém, este valor de ligação deve ser interpretado com cautela uma vez que Phe398 é o último resíduo na extremidade da cadeia da alça  $\beta$  do GlyR cuja estrutura foi elucidada na estrutura cristalográfica. Desta forma, pela ausência do resíduo subsequente,

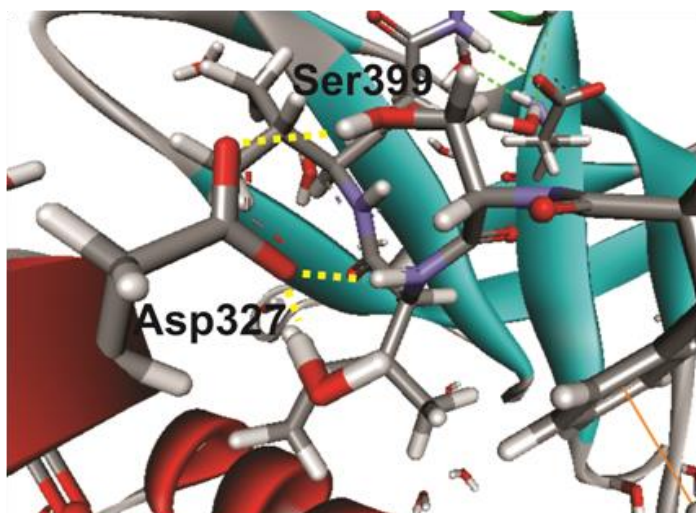
que serviria de resíduo *cap* no esquema de MFCC, foi utilizado somente um átomo de hidrogênio para completar a valência na ligação peptídica rompida pelo processo de fragmentação. Este tratamento diferenciado dado ao resíduo Phe398 (GlyR) permitiu a sua inclusão em nossos cálculos teóricos, mas pode levar a descaracterização da distribuição eletrônica local encontrada na proteína e com isto gerar alguma discrepância no real valor de ligação entre estes dois resíduos de aminoácidos. Além disso, o alto valor energético encontrado está em conflito com a conclusão de Kim (Kim et al., 2006), o qual destaca que Arg653, assim como Ile656 e Gln683 também não mostram um impacto crítico sobre a ligação.” (Figura 6).



**Figura 6:** Interação sigma- $\pi$  entre resíduos de aminoácido Phe398 (GlyR) e Arg653 (gefirina). Esta ligação está representada pelo tracejado amarelo.

Com uma energia de ligação de  $-23,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ , sendo a terceira mais energética, temos o par formado por Asp327 (gefirina) e Ser399 (GlyR). Esta interação se dá através de uma ligação de hidrogênio, envolvendo o grupamento hidroxil do resíduo Ser399 e o grupo carboxil do Asp327 (Figura 7). Também,

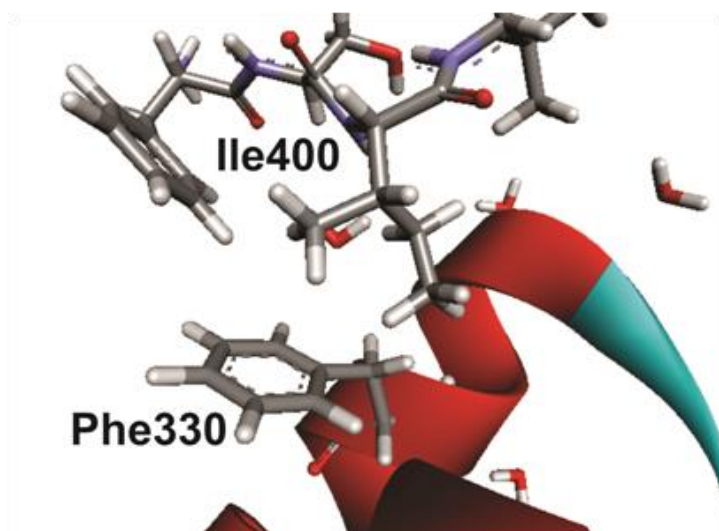
reforçando a estabilidade nesta região, observa-se a interação entre Asp327 e o grupamento amida na ligação peptídica entre Ser399 e Ile400. Novamente, apesar de sua elevada contribuição individual para a manutenção do complexo, esta interação não foi considerada essencial segundo a análise informada por Kim e colaboradores (Kim et al., 2006).



**Figura 7: Interação entre resíduos de aminoácido Ser399 (GlyR) e Asp327 (gefirina).** Em linhas amarelas estão representadas interações de hidrogênio.

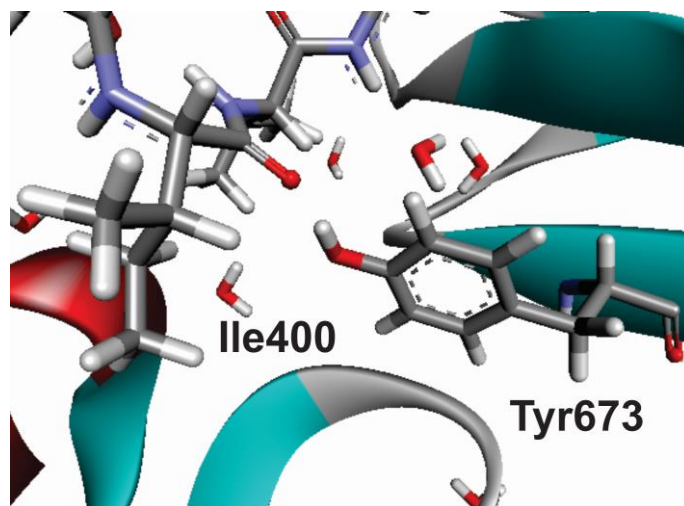
Seguindo a lista, temos uma interação hidrofóbica entre Phe330 da gefirina e Ile400 da GlyR, cuja energia é de  $-16,51 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Phe330 está localizado na  $\alpha$ -hélice do subdomínio III. O sítio de ligação da gefirina com o GlyR é formado por uma fenda onde a alça  $\beta$  do GlyR fica “empacotada” assumindo a forma de uma letra “C” (Figura 8). Cada monômero de gefirina-E pode ser dividido em quatro subdomínios, sendo eles I, II, III e IV. Assim, o sulco onde está localizado o sítio de ligação tem a sua parede “esquerda” formada pelo subdomínio IV, incluindo resíduos 713-719. O “fundo” também é formado pelo subdomínio IV, enquanto que a parede de “baixo” é formada pela primeira  $\alpha$ -hélice do

subdomínio III e pelos resíduos Leu637 e Arg653. A parede “direita”, a qual fica na parte interna do “C”, é constituída pelo subdomínio IV’ do segundo monômero da gefirina-E. Phe330 é descrito como “crucial” para a ligação gefirina–GlyR (Kim et al., 2006), e no presente trabalho essa informação foi confirmada através da avaliação das energias de ligação.



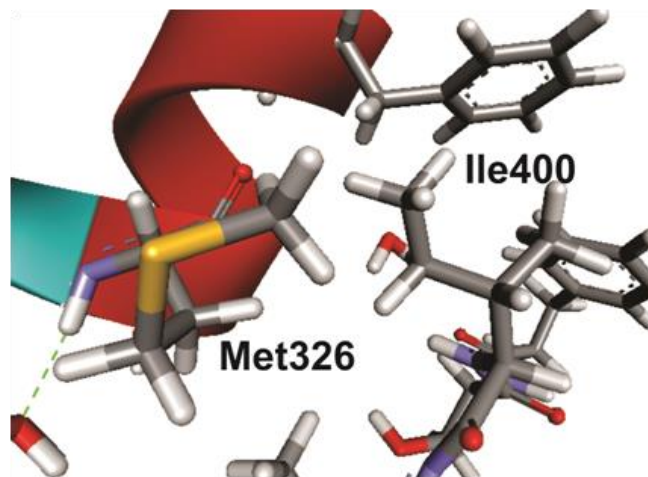
**Figura 8: Interação entre resíduos de aminoácido Ile400 (GlyR) e Phe330 (gefirina).** Em linhas amarelas estão representadas interações de hidrogênio.

A quinta maior energia entre dois resíduos de gefirina e GlyR é de  $-16,06 \text{ kcal mol}^{-1}$  e ocorre entre Tyr673 da gefirina e Ile400 do GlyR. Existe uma ligação de hidrogênio entre a carbonila presente na cadeia principal do Ile400 e o grupamento hidroxila presente no fenol do Tyr673. Esta ligação não foi demonstrada por Kim e colaboradores (2006), porém, a deleção dessa ligação de hidrogênio, através da conversão de tirosina em fenilalanina reduz drasticamente a interação total entre gefirina e GlyR.



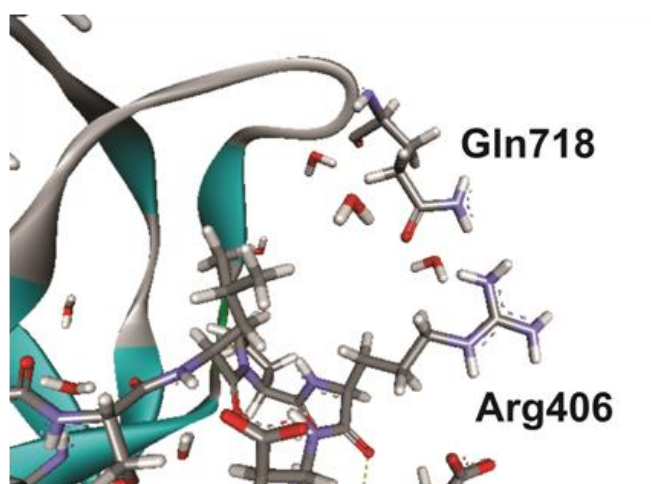
**Figura 9: Interação entre resíduos de aminoácido Ile400 (GlyR) e Tyr673 (gefirina).** Em linhas amarelas estão representadas interações de hidrogênio.

Met326 da gefirina e Ile400 do GlyR possuem interações hidrofóbicas que totalizam uma energia de ligação de  $-14,44 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Essa ligação é a sexta mais energética e também tem sua existência confirmada pela cristalografia. Nosso achado destaca, por outro lado, que a importância individual dessa ligação provavelmente é subestimada por Kim e colaboradores (2006), devido ao seu alto valor energético (Figura 10).



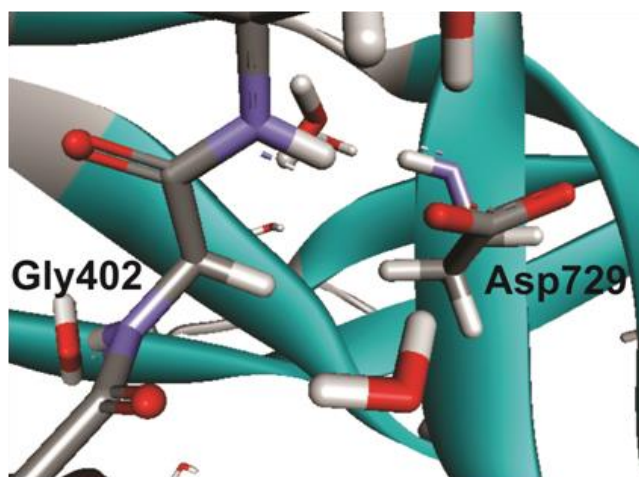
**Figura 10:** Interação entre resíduos de aminoácido Ile 400 (GlyR) e Met326 (gefirina). Em linhas amarelas estão representadas interações de hidrogênio.

Também destacada por Kim e colaboradores (2006), a interação entre Gln718 (gefirina) e Arg406 (GlyR) representou uma força atrativa de  $-14,30 \text{ kcal mol}^{-1}$ , conforme nosso estudo (figura 11). Todavia, esta interação deve ser tratada com cautela e melhor caracterizada em estudos futuros, uma vez que “a cadeia lateral da arginina está apenas pobremente definida nos mapas de densidade eletrônica”.



**Figura 11: Interação entre resíduos de aminoácido Arg406 (GlyR) e GLN718 (gefirina).** Em linhas amarelas estão representadas interações de hidrogênio.

Em oitavo temos a energia de  $-13,69 \text{ kcal mol}^{-1}$  entre Asp729 da gefirina e Gly402 do GlyR. A importância dessa ligação não foi descrita nos trabalhos consultados, porém vem a reforçar a importância energética de Asp729 na manutenção da ligação entre gefirina e GlyR, uma vez que este resíduo de aminoácido participa de fortes interações com mais de um resíduo vizinho.



**Figura 12: Interação entre resíduos de aminoácido Gly402 (GlyR) e Asp279 (gefirina).** Em linhas amarelas estão representadas interações de hidrogênio.

Asp327 da gefirina também participa de uma ligação de hidrogênio envolvendo o grupamento amida da Ile400 do GlyR, fazendo com que a energia de ligação de  $-12,74 \text{ kcal mol}^{-1}$  entre estes dois resíduos de aminoácidos ocupe a nona colocação do nosso *ranking*.

Entre Tyr673 da gefirina e Val401 do GlyR há uma energia de ligação de  $-12,24 \text{ kcal mol}^{-1}$ , sendo esta de origem hidrofóbica. No cálculo envolvendo

esses dois resíduos foi considerada a presença de uma molécula de água entre ambos, a qual caracterizou-se como *shielding*. Com relação a Val401, Kneussel e colaboradores (Kneussel and Betz, 2000), também através de mutagênese direcionada, concluíram que após mudanças singulares em resíduos com cadeias laterais que continham propriedades hidrofóbicas, incluindo Val401, a ligação entre gefirina e GlyR ainda acontecia. Porém, quando as mutações se somam, não ocorre a ligação.

Nosso trabalho encontrou algumas discrepâncias com relação ao trabalho de Kim e colaboradores (2006). Como exemplo podemos citar as interações de hidrogênio entre Asp327 da gefirina e Ser399 do GlyR e também entre Asp327 e Ile400 do GlyR. Apesar de nossos resultados mostrarem que estas ligações são importantes energeticamente na força de ligação individual de cada resíduo, o outro trabalho mostra que eles têm sua importância individual suplantada pelo somatório das forças hidrofóbicas presentes ao longo da interface gefirina – GlyR, segundo ele mais importantes em um contexto geral. Tendo isso em vista, vale destacar o Asp729, o qual contribui com nada menos que  $-45,78 \text{ kcal mol}^{-1}$ , dividida entre Gly402 e Ser403 do GlyR. Ressaltamos também a própria Asp327 da gefirina, com contribuição total de  $-36,24 \text{ kcal mol}^{-1}$ , dividida entre Ser399 e Ile400 do GlyR, como descrito acima. E apesar da importância individual dos resíduos de aminoácidos recém citados e pertencentes à gefirina, os resíduos pertencentes à alça  $\beta$  do GlyR assumem importância tão grande quanto ou ainda maior, visto que estão em número de apenas 13. Assim, cada resíduo interage com mais de um resíduo de gefirina no sítio de ligação.



Ainda com relação às discordâncias entre o presente trabalho e o trabalho publicado por Kim e colaboradores (2006), podemos citar a interação entre Lys658 da gefirina e Ser403 do GlyR, a qual é descrita por Kim como contendo ligações de hidrogênio e cujo valor energético de ligação encontrado no presente trabalho é de apenas  $-3,40 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Apesar de algumas discordâncias, várias ligações descritas como importantes foram aqui confirmadas, como por exemplo, a ligação hidrofóbica entre Phe330 da gefirina e Ile400 do GlyR, com energia de  $-16,51 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Assim, parece haver um consenso na literatura de que as interações hidrofóbicas possuem um peso maior que as ligações de hidrogênio para manter gefirina e GlyR unidos, mas de forma geral e não individual (Kim et al., 2006; Kneussel and Betz, 2000).

Por fim, o valor energético total de ligação calculado em nosso trabalho através de método *ab initio* e levando-se em consideração apenas resíduos de aminoácidos que se encontravam a uma distância igual ou menor a 5 Å do resíduo analisado é de  $-343,49 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Os resultados aqui apresentados referem-se a um olhar mais detalhado nas interações moleculares que regem o ancoramento do receptor de glicina pela gefirina. Pela natureza dos dados cristalográficos disponíveis e aqui analisados, os valores referentes a forças de interação levaram em conta a proximidade da alça  $\beta$  do receptor de glicina com um dímero formado por duas subunidades E da gefirina analisando a complexação de monômeros. Estes resultados possibilitam uma nova abordagem para estudos futuros relacionados com a organização estrutural do receptor de glicina, além de serem fundamentais para

novas análises comparativas com cristais do receptor em condições alteradas, como, provavelmente, em doenças e transtornos relacionadas a glicina.

## 5. CONCLUSÕES

A análise individualizada das forças de interação entre pares de resíduos de aminoácidos presentes na interface das estruturas subunidade-E da gefirina e alça  $\beta$  do receptor de glicina permitem elucidar as principais contribuições para a estabilização deste complexo. Todas as interações aqui estudadas apresentam energias atrativas, sendo aquela entre Asp729 (gefirina) / Ser403 (GlyR) a mais representativa, seguida de Arg653 (gefirina) / Phe398 (GlyR), Asp327 (gefirina) / Ser399 (GlyR) e Phe330 (gefirina) / Ile400 (GlyR), entre outras. Estes resultados contribuem para o enriquecimento do conhecimento acerca da formação e estabilização do complexo gefirina-GlyR, a qual é fundamental para a adequada localização e resposta fisiológica de receptores de glicina.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, S., Tannenberg, R. K. e P. R. Dodd. Reduced expression of the inhibitory synapse scaffolding protein gephyrin in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, v.14, n.3, Jul, p.313-21. 2008.
- Alonso, J. L., Andrade, X., Echenique, P., Falceto, F., Prada-Gracia, D. e A. Rubio. Efficient formalism for large-scale ab initio molecular dynamics based on time-dependent density functional theory. *Phys Rev Lett*, v.101, n.9, Aug 29, p.096403. 2008.
- Barroso-Neto, I. L., Marques, J. P. C., da Costa, R. F., Caetano, E. W. S., Cavada, B. S., Gottfried, C. e V. N. Freire. Inactivation of ovine cyclooxygenase-1 by bromoaspirin and Aspirin: a quantum chemistry description. *J Phys Chem B*. 116, v.116, n.10, Feb, p.3270-9. 2012.
- Bethanis, K., Tzamalís, P., Hountas, A. e G. Tsoucaris. Ab initio determination of a crystal structure by means of the Schrodinger equation. *Acta Crystallogr A*, v.58, n.Pt 3, May, p.265-9. 2002.
- Betz, H. Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends Neurosci*, v.14, n.10, Oct, p.458-61. 1991.
- Betz, H., Langosch, D., Rundstrom, N., Bormann, J., Kuryatov, A., Kuhse, J., Schmieden, V., Matzenbach, B. e J. Kirsch. Structure and biology of inhibitory glycine receptors. *Ann N Y Acad Sci*, v.707, n.1, Dec, p.109-15. 1993.
- Chen, X., Zhang, Y. e J. Z. Zhang. An efficient approach for ab initio energy calculation of biopolymers. *J Chem Phys*, v.122, n.18, May 8, p.184105. 2005.
- Cossio, P., Trovato, A., Pietrucci, F., Seno, F., Maritan, A. e A. Laio. Exploring the universe of protein structures beyond the Protein Data Bank. *PLoS Comput Biol*, v.6, n.11, p.e1000957. 2010.
- da Costa, R. F., Freire, V. N., Bezerra, E. M., Cavada, B. S., Caetano, E. W., de Lima Filho, J. L. e E. L. Albuquerque. Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations. *Phys Chem Chem Phys*, v.14, n.4, Jan 28, p.1389-98. 2012.
- Delley, B. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. *J Chem Phys*, v.92, n.1, Jan, p.508-17. 1990.

- Delley, B. From molecules to solids with the DMol[sup 3] approach. *J Chem Phys.* v.113, n.18, Nov, p.7756-64. 2000.
- Dumoulin, A., Levi, S., Riveau, B., Gasnier, B. e A. Triller. Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. *Eur J Neurosci*, v.12, n.11, Nov, p.3883-92. 2000.
- Dumoulin, A., Rostaing, P., Bedet, C., Levi, S., Isambert, M. F., Henry, J. P., Triller, A. e B. Gasnier. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci*, v.112 ( Pt 6), Mar, p.811-23. 1999.
- Fritschy, J. M., Harvey, R. J. e G. Schwars. Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends Neurosci*, v.31, n.5, May, p.257-64. 2008.
- Gao, A. M., Zhang, D. W., Zhang, J. Z. H. e Yingkai Zhang. An efficient linear scaling method for ab initio calculation of electron density of proteins. *Chem Phys Lett*, v.394, n.4-6, Aug 21, p.293-97. 2004.
- Gironell, A., Figueiras, F. P., Pagonabarraga, J., Herance, J. R., Pascual-Sedano, B., Trampal, C. e J. D. Gispert. Gaba and serotonin molecular neuroimaging in essential tremor: a clinical correlation study. *Parkinsonis Relat Disord*, v.18, n.7, May 16, p.876-80. 2012.
- Gordon, M. S., Fedorov, D. G., Pruitt, S. R. e L. V. Slipchenko. Fragmentation methods: a route to accurate calculations on large systems. *Chem Rev*, v.112, n.1, Aug 26, p.632-72. 2011.
- Hanus, C., Vannier, C. e A. Triller. Intracellular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate. *J Neurosci*, v.24, n.5, Feb 4, p.1119-28. 2004.
- Harvey, R. J. e H. Betz. *Glycine Receptors: John Wiley and Sons, Inc.* 2001. 912 p. (eLS)
- He, X. e J. Z. Zhang. A new method for direct calculation of total energy of protein. *J Chem Phys*, v.122, n.3, Jan 15, p.31103. 2005.
- Hohenberg, P. e W. Kohn. Inhomogeneous electron gas. *Phys Rev*, v.136, n.3B, Nov, p.864-71. 1964.
- Joshi, B. D., Srivastava, A., Tandon, P. e S. Jain. Molecular structure, vibrational spectra and HOMO, LUMO analysis of yohimbine hydrochloride by density

- functional theory and ab initio Hartree-Fock calculations. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, v.82, n.1, Nov, p.270-8. 2011.
- Kim, E. Y., Schrader, N., Smolinsky, B., Bedet, C., Vannier, C., Schwars, G. e H. Schindelin. Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin. *Embo J*, v.25, n.6, Mar 22, p.1385-95. 2006.
- Kirsch, J. e H. Betz. The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci*, v.15, n.6, Jun, p.4148-56. 1995.
- Kneussel, M. e H. Betz. Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci*, v.23, n.9, Sep, p.429-35. 2000.
- Kohn, W. e L. J. Sham. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys Rev*, v.140, n.4A, Nov, p.1133-38. 1965.
- Lardi-Studler, B., Smolinsky, B., Petitjean, C. M., Koenig, F., Sidler, C., Meier, J. C., Fritschy, J. M. e G. Schwars. Vertebrate-specific sequences in the gephyrin E-domain regulate cytosolic aggregation and postsynaptic clustering. *J Cell Sci*, v.120, n.Pt 8, Apr 15, p.1371-82. 2007.
- Legendre, P. The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci*, v.58, n.5-6, May, p.760-93. 2001.
- Levi, S., Chesnoy-Marchais, D., Sieghart, W. e A. Triller. Synaptic control of glycine and GABA(A) receptors and gephyrin expression in cultured motoneurons. *J Neurosci*, v.19, n.17, Sep 1, p.7434-49. 1999.
- Liu, W. e R. Franke. Comprehensive relativistic ab initio and density functional theory studies on PtH, PtF, PtCl, and Pt(NH(3))(2)Cl(2). *J Comput Chem*, v.23, n.5, Apr 15, p.564-75. 2002.
- Maas, C., Belgardt, D., Lee, H. K., Heisler, F. F., Lappe-Siefke, C., Magiera, M. M., van Dijk, J., Hausrat, T. J., Janke, C. e M. Kneussel. Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.106, n.21, May 26, p.8731-6. 2009.
- Maas, C., Tagnaouti, N., Loebrich, S., Behrend, B., Lappe-Siefke, C. e M. Kneussel. Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *J Cell Biol*, v.172, n.3, Jan 30, p.441-51. 2006.

- Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H. e D. Langosch. Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron*, v.15, n.3, Sep, p.563-72. 1995.
- Moss, S. J. e T. G. Smart. Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci*, v.2, n.4, Apr, p.240-50. 2001.
- Perdew, J. P. e Y. Wang. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. *Phys Rev B*, v.45, n.23, Jun 15, p.13244-49. 1992.
- Pfeiffer, F., Graham, D. e H. Betz. Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem*, v.257, n.16, Aug 25, p.9389-93. 1982.
- Piton, A., Jouan, L., Rochefort, D., Dobrzyniecka, S., Lachapelle, K., Dion, P. A., Gauthier, J. e G. A. Rouleau. Analysis of the effects of rare variants on splicing identifies alterations in GABA(A) receptor genes in autism spectrum disorder individuals. *Eur J Hum Genet*, v.1, n.8, Nov 21, in press. 2012.
- Ramanathan, S., Woodroffe, A., Flodman, P. L., Hanouni, M., Modahl, C. B., Steinberg-Epstein, R., Bocian, M. E., Spence, M. A. e M. Smith. A case of autism with an interstitial deletion on 4q leading to hemizyosity for genes encoding for glutamine and glycine neurotransmitter receptor sub-units (AMPA 2, GLRA3, GLRB) and neuropeptide receptors NPY1R, NPY5R. *BMC Med Genet*, v.5, n.10, Apr 16, in press. 2004.
- Rees, M. I., Harvey, K., Ward, H., White, J. H., Evans, L., Duguid, I. C., Hsu, C. C., Coleman, S. L., Miller, J., Baer, K., Waldvogel, H. J., Gibbon, F., Smart, T. G., Owen, M. J. e R. J. Harvey. Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (GPHN), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. *J Biol Chem*, v.278, n.27, Jul 4, p.24688-96. 2003.
- Schrader, N., Kim, E. Y., Winking, J., Paulukat, J., Schindelin, H. e G. Schwars. Biochemical characterization of the high affinity binding between the glycine receptor and gephyrin. *J Biol Chem*, v.279, n.18, Apr 30, p.18733-41. 2004.
- Schrodinger, L. L. C. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1. Aug, 2010.
- Schwarz, G. Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell Mol Life Sci*, v.62, n.23, Dec, p.2792-810. 2005.

- Seidahmed, M. Z., Salih, M. A., Abdulbasit, O. B., Shaheed, Hussein, K. A., Miqdad, A. M., Rasheed, A. K. A., Alazami, A. M., Alorainy, I. A. e F. S. Alkuraya. A novel syndrome of lethal familial hyperekplexia associated with brain malformation. *BMC Neurol*, v.12, n.125, Oct 27, in press. 2012.
- Sheng, M. e D. T. Pak. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annu Rev Physiol*, v.62, p.755-78. 2000.
- Siegel, R., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K. e M. D. Uhler. *Basic Neurochemistry - Molecular, Cellular and Medical Aspects*. EUA: Raven Press. 2005.
- Smolinsky, B., Eichler, S. A., Buchmeier, S., Meier, J. C. e G Schwars. Splice-specific functions of gephyrin in molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem*, v.283, n.25, Jun 20, p.17370-9. 2008.
- Sola, M., Bavro, V. N., Timmins, J., Franz, T, Ricard-Blum, S., Schoehn, G., Ruigrok, R. W., Paarmann, I., Saiyed, T., O'Sullivan, G. A., Schmitt, B., Betz, H. e W. Weissenhorn. Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *Embo J*, v.23, n.13, Jul 7, p.2510-9. 2004.
- Studler, B., Sidler, C. e J. M. Fritschy. Differential regulation of GABA(A) receptor and gephyrin postsynaptic clustering in immature hippocampal neuronal cultures. *J Comp Neurol*, v.484, n.3, Apr 11, p.344-55. 2005.
- Sun, H. COMPASS: An ab initio force-field optimized for condensed-phase applications overview with details on alkane and benzene compounds. *J Phys Chem B*, v.102, n.38, Aug 29, p.7338-64. 1998.
- Sun, H., Ren, P. e J. R. Fried. The COMPASS force field: parameterization and validation for phosphazenes. *Comp Theo Polym Sci*, v.8, n.1-2, p.229-46. 1998.
- Tellez, C. A., Hollauer, E., Giannerini, T., da Silva, M. I., Mondragon, M. A., Rodriguez, J. R. e V. M. Castano. Fourier transform infrared and Raman spectra. Semi empirical AM1 and PM3; MP2/DZV and DFT/B3LYP-6-31G(d) ab initio calculations for dimethylterephthalate (DMT). *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, v.60, n.8-9, Jul, p.2171-80. 2004.
- Tretter, V., Mukherjee, J., Maric, H. M., Schindelin, H., Sieghart, W. e S. J. Moss. Gephyrin, the enigmatic organizer at GABAergic synapses. *Front Cell Neurosci*, v.6, n.1, May 15, p.23. 2012.

- Triller, A., Cluzaud, F., Pfeiffer, F., Betz, H. e H. Korn. Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study. *J Cell Biol*, v.101, n.2, Aug, p.683-8. 1985.
- Tyagarajan, S. K. e J. M. Fritschy. GABA(A) receptors, gephyrin and homeostatic synaptic plasticity. *J Physiol*, v.588, n.Pt 1, Jan 1, p.101-6. 2010.
- Xiang, S., Nichols, J., Rajagopalan, K. V. e H. Schindelin. The crystal structure of *Escherichia coli* MoeA and its relationship to the multifunctional protein gephyrin. *Structure*, v.9, n.4, Apr 4, p.299-310. 2001.
- Young-Pearse, T. L., Ivic, L., Kriegstein, A. R. e C. L. Cepko. Characterization of mice with targeted deletion of glycine receptor alpha 2. *Mol Cell Biol*, v.26, n.15, Aug, p.5728-34. 2006.
- Zanatta, G., Barroso-Neto, I. L., Bambini-Junior, V., Dutra, M. F., Bezerra, E. M., da Costa, R. F., Caetano, E. W. S., Cavada, B. S., Freire, V. N. e C. Gottfried. Quantum biochemistry description of the human dopamine D3 receptor in complex with the selective antagonist eticlopride. *J Proteomics Bioinform*, v.5, n.7, p.155-62. 2012.
- Zhang, D. W., Chen, X. H. e J. Z. Zhang. Molecular caps for full quantum mechanical computation of peptide-water interaction energy. *J Comput Chem*, v.24, n.15, Nov 30, p.1846-52. 2003.
- Zhang, D. W. e J. Z. H. Zhang. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein--molecule interaction energy. *J Chem Phys*, v.119, n.7, May 23, p.3599-3605. 2003.
- Zigmond, M., Bloom, F. E., Landis, S. C., Roberts, J. L. e L. R. Squire. *Fundamental Neuroscience*. EUA: Academic Press. 2009.