

# **Aplicación de modelos atomistas para predecir la unión de isoformas NLGN3 a Neurexin 1- Beta**

**N. Doana, T. A. Deishera, S. Solaresb, Z. Talebizadehc aSound Choice Pharmaceutical Institute, Seattle, WA; b University of Maryland, College Park, MD; cChildren's Mercy Hospital and University of Missouri-Kansas City, Kansas City, MO**

## **Introducción**

Los trastornos del espectro autista se han asociado con más de 300 mutaciones genéticas. Como enfermedad poligénica, los TEA requieren como mínimo una agresión adicional, además de la susceptibilidad genética subyacente para la manifestación del fenotipo de la enfermedad (Caldwell, 2010). Por ejemplo, Bradley et. Alabama. (2010) han identificado grandes deleciones de novo en exones NRXN1 (neurexina 1) asociados con probandos de TDAH. Cabe destacar que muchos estudios, incluido Anello 2009, demuestran que la prevalencia del autismo es cuatro o más veces mayor en hombres que en mujeres. Por lo tanto, se supone que los genes del cromosoma X son especialmente importantes en la etiología de la enfermedad (Smith, Anne y Flodman, 2009). Entre todos los genes asociados con el autismo ubicados en el cromosoma X, la neuroligina 3 (NLGN3) ha sido bien estudiada en relación con los TEA. Además, se cree que "las alteraciones en los circuitos neuronales y/o la señalización neuronal son responsables de las aberraciones conductuales y cognitivas en pacientes con autismo" (Chih et al., 2004). Como proteína post-sináptica, NLGN3 se une con las Neurexinas, proteínas pre-sinápticas que desencadenan la diferenciación post-sináptica a través de sus ligandos, las neuroliginas, que a su vez desencadenan la diferenciación pre-sináptica. Por lo tanto, su unión impacta entre las células nerviosas y la comunicación de las mismas. Una mutación puntual en NLGN3 (R451C), que se encuentra en dos hermanos con TEA, conduce a la retención de la proteína del retículo endoplásmico y reduce la unión a neurexina del NLGN3 mutado que se expresa en la superficie (Chih et al., 2004). Sin embargo, el cribado poblacional indica que las mutaciones NLGN y NRXN son raras entre los TEA en general. En 2006, Talebizadeh et al. identificaron la expresión de dos isoformas de NLGN3 en muestras linfoblastoides de ASD de sujetos autistas. Una de las dos isoformas es una isoforma NLGN3 truncada que falta en el exón 7 que usa una estructura tridimensional predicha para los dominios similares a esterasa de NLGN3. Hasta la fecha, se han aislado 6 isoformas. Sin embargo, no se ha informado el modelado estructural predicho de varios patrones de expresión de isoformas sobre la unión de neurexina y la formación de sinapsis. En este estudio, las estructuras terciarias de varias isoformas de NLGN3 se predicen mediante el modelado de subprocesos. Estas estructuras se equilibran y optimizan mediante la aplicación de atomización para obtener una comprensión más profunda de la interacción entre la neurexina 1-beta y varias

isoformas de NLGN3, así como crear estructuras de proteínas finas para las isoformas de NLGN3 y NRX1β.

	NLGN3	Coding Exon	NRXN beta 1
Ca 2+	Gly 360	7	Asn 238
	Gln 359	7	Asp 137
			Val 154
			Ile 236
Direct Interaction	Gln 359	7	
	Gly 360		
	Glu 361		
	Phe 362		
	Leu 363		
	Asn 364		
	Tyr 463		
	Gly 464		
	His 268/Glu 270	6	
Salt Bridge	Glu 361/Glu 270	6	Arg 109
	Asp 351	7	Arg 232
Polar Interaction	Arg 561	8	Asn 103

Tabla 1. Contactos NLGN3 y NRX1B esperados basados en la estructura cristalina publicada. En NLGN3, se observa que los exones 6, 7 y 8 tienen interacciones directas, salinas y polares con NRX1β. En particular, el exón 7 está involucrado en la unión de Ca<sup>2+</sup>, un factor crucial en la interacción neurologina-neurexina.

## Metodos y Resultados

Seis variantes de empalme NLGN3 extraídas de células linfoblastoides de sujetos autistas se secuenciaron para obtener secuencias proteicas completas. La estructura de proteínas prevista de cada variante fue generada por el servidor web I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). La estructura de la proteína NRX1β se extrajo de una estructura publicada de NLGN4X y NRX1β de NCBI. Para determinar los posibles residuos implicados en la unión entre las seis variantes de NLGN3 y NRX1β, se utilizó la estructura cristalina publicada de NLGN4X, que es altamente homóloga a NLGN3, del Protein Data Bank, además de un estudio publicado por Fabrichny et al. (2007) La estructura cristalina NLGN3 de longitud completa no estaba disponible desde el PDB. NAMD, un protocolo de dinámica molecular escalable, se utilizó para optimizar y equilibrar la estructura tridimensional de cada variante NLGN3

antes del acoplamiento con NRX1 $\beta$ . Luego se aplicó el software de acoplamiento, Rosetta Dock Protein-Protein Server (<http://rosettadock.graylab.jhu.edu/>) para acoplar o combinar cada variante de NLGN3 con NRX1 $\beta$ . Los resultados de acoplamiento se refinaron y equilibraron posteriormente utilizando NAMD, a través de procesos de minimización y modelado dinámico.

Isoform	Length	Exon loss
V1	848	wildtype
V2	828	3, part of 4
V3	808	3, 4
Ve345	758	3, 4, 5
Ve7	344	7, 8
Vi2	218	3, 4, 5, 6, 7, 8

Tabla 2- Características de cada isoforma NLGN3 incluyendo su longitud de aminoácidos y pérdida de exón.

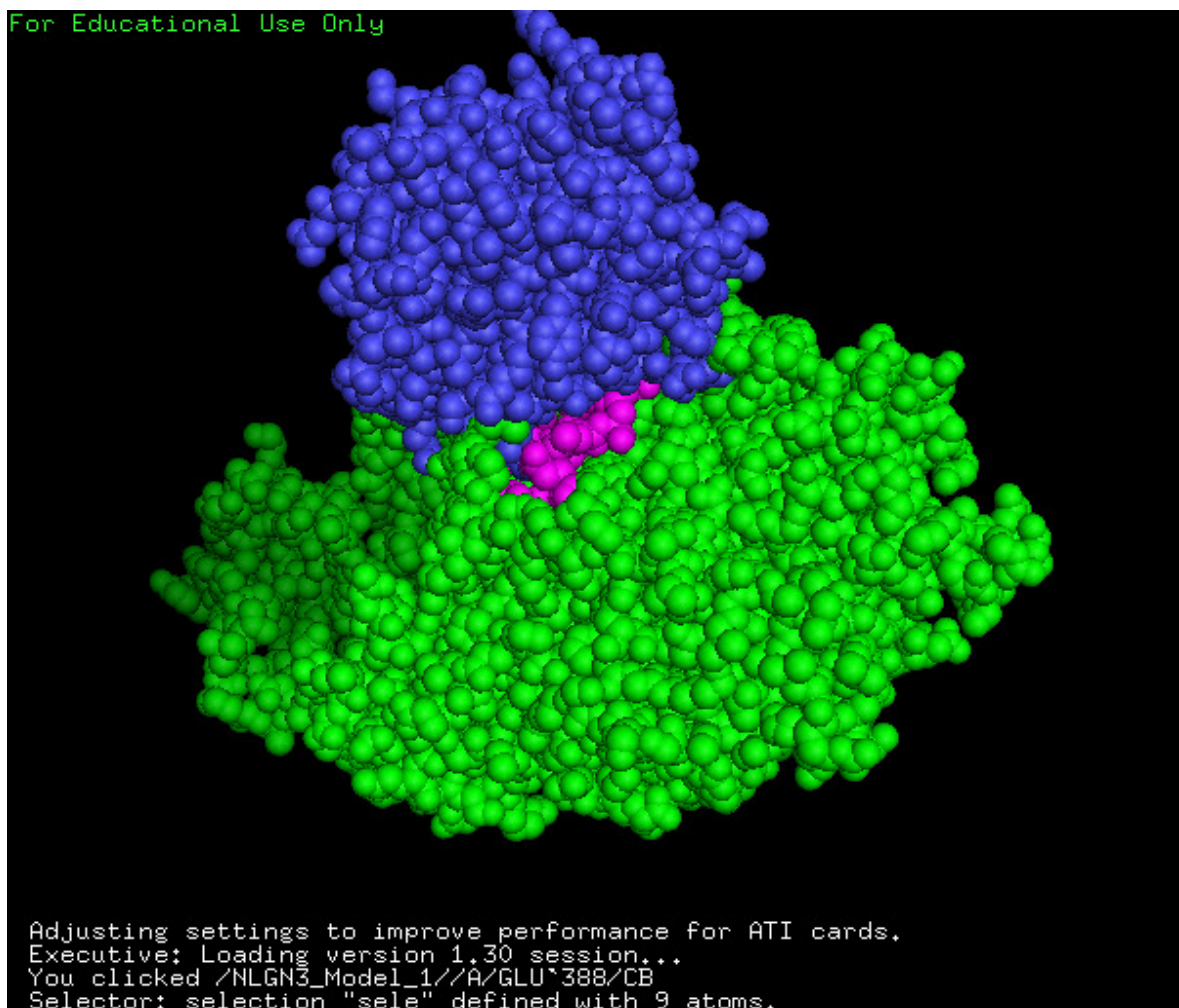
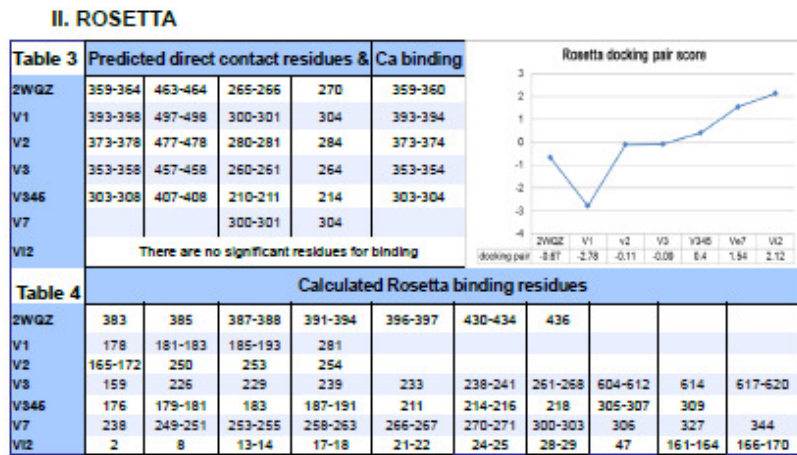


Figura 1- Una estructura proteica de la isoforma NLGN3 V1 (verde) acoplada con NRX1β (azul) analizada por PyMol. Los residuos de la isoforma V1 de NLGN3 implicados en la unión directa con NRX1β de color rosa incluyen Gly 360, Gln 359, Glu 361, Phe 362, Leu 363, Asn 364, Tyr 463, Gly 464, His 268, Glu 270, Asp 351 y Arg 561.

## II

I- TASSER Para cada NLGN3, el servidor I-TASSER predice las cinco estructuras principales. La estructura mejor clasificada de cada isoforma NLGN3 fue muy similar a la neuroligina 4 publicada en el cromosoma X (NGLN4X) llamada 2WQZ que faltan los exones 1 y 2.



La Tabla 3 (tabla superior) muestra los residuos de cada isoforma NLGN3 que se predice que están involucrados en la unión de neuroligina a neurexina en base a la estructura cristalina de la Tabla 1. La Tabla 4 (debajo de la tabla) muestra la salida de Rosetta de los residuos calculados de las isoformas de NLGN3 acopladas con NRX1β.

El gráfico 1 (arriba a la izquierda) muestra la energía del par de acoplamiento, que es la puntuación del emparejamiento de residuos que interactúan entre dos proteínas individuales durante el acoplamiento. En la tabla, la primera isoforma V1, que contiene todos los exones, tiene la energía de par de acoplamiento más baja; mientras que las otras isoformas, que faltan 2 exones o más, requieren más energía para acoplarse con NRX1β.

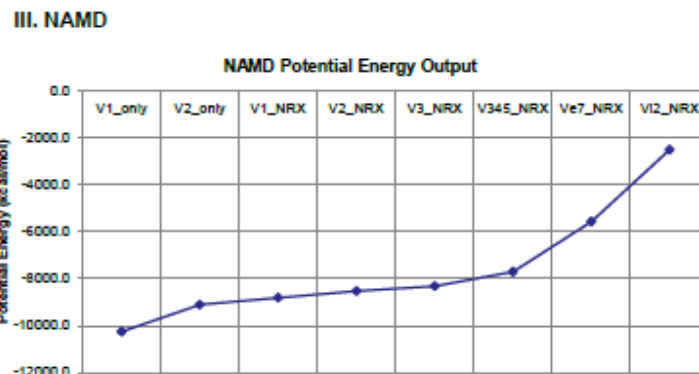


Tabla 5- Salida de energía potencial de NAMD para las isoformas NLGN3 V1, V2 y el complejo NLGN3-NRX. La energía potencial de NAMD se calculó utilizando el campo de fuerza de la mecánica molecular y el cambio en la energía de solvatación y el campo de fuerza CHARMM22 / CMAP.

	V1_only	V2_only	V1_NRX	V2_NRX	V3_NRX	V345_NRX	Ve7_NRX	Vi2_NRX
Potential Energy	-10255.2	-9104.9	-8809.0	-8525.0	-8320.2	-7705.1	-5569.9	-2502.0
Ratio to V1_only	1	0.888	0.859	0.831	0.811	0.751	0.543	0.244
percentage change from V1_only		11%	14%	17%	19%	25%	46%	76%
percentage difference from V1_only		12%	15%	18%	21%	28%	59%	122%
Ratio to V1_NRX			1.000	0.968	0.945	0.875	0.632	0.284
percentage change from V1_NRX				3%	6%	13%	37%	72%
percentage difference from V1_NRX				3%	6%	13%	45%	112%



## Discusión

Con un protocolo de subprocesamiento completo de I-TASSER, se ha predicho que las estructuras terciarias para todas las isoformas NLGN3 se acoplarán. La energía del par de acoplamiento calculada por Rosetta, que representa la energía necesaria para atracar los residuos, demuestra una correlación entre el número de exones faltantes y las energías de unión desfavorables NLGN3 - NRX1 $\beta$ . Estos resultados muestran que los exones faltantes en las isoformas de NLGN3 podrían conducir a una energía de unión desfavorable durante el proceso de acoplamiento entre NLGN3 y NRX1 $\beta$ . Estas estructuras de acoplamiento se refinan posteriormente mediante el equilibrio de la dinámica molecular mediante el software NAMD. Según la producción de energía potencial, las isoformas V1 y V2 se clasifican como las más altas con solo un 3% de diferencia de energía entre ellas. Las otras estructuras de isoformas tienen una diferencia de energía del 6% al 112%. La clasificación muestra que V1 y V2 tienen una mayor capacidad de predecir la conformación correcta del plegamiento intermedio de las estructuras de acoplamiento predichas que otras isoformas. Especialmente, la diferencia porcentual aumenta del 13% al 45% e incluso del 112% para las isoformas Ve7 y Vi2, respectivamente, a las que les falta el exón 7. Por lo tanto, los resultados de NAMD son consistentes con el resultado del estudio de Talebizadeh et al. (2006) sobre la importancia del exón 7 en la unión de NLGN3-NRX1 $\beta$ . Desafortunadamente, los residuos de salida del servidor web Rosetta de las isoformas de NLGN3 que se acoplan con NRX1 $\beta$  son diferentes a los residuos del estudio de Fabrichny et al. (2007) Se debe a la limitación del número de residuos de entrada y al protocolo de acoplamiento fijo. Sugerimos escribir nuestro propio protocolo para Rosetta que sea más aplicable al proyecto.

## Resumen

1. I-TASSER es una herramienta integral de servidor web para generar estructuras tridimensionales. El software Rosetta y NAMD son capaces de crear el complejo de acoplamiento NLGN3 y NRX1 $\beta$  y luego refinar esas estructuras.

2. El resultado de Rosetta muestra la unión desfavorable entre NLGN3 y NRX1 $\beta$  cuando faltan exones, especialmente el exón 7. La producción de energía NAMD muestra que el tipo salvaje V1 y V2 tienen más capacidad de predecir la conformación correcta.

## Referencias

1. Bradley, W. E., Raelson, J. V., Dubois, D. Y., Godin, E., Fournier, H., Prive, C., et al. (2010). Hotspots of Large Rare Deletions in the Human Genome. *PLOS* , 5 (2), 1-7.
2. Ezzeldin, Hussein M., Jeffery B. Klauda, and Santiago D. Solares. "Molecular Mechanics- and Dynamics-Based Modeling of the Major Gas Vesicle Protein, GvpA." *Journal of Structural Biology*, 2011.
3. Fabrichny, Igor P., Philippe Leone, Gerlind Sulzenbacher, Davide Comoletti, and Meghan T. Miller. "Structural Analysis of the Synaptic Protein Neuroligin and Its b-Neurexin Complex: Determinants for Folding and Cell Adhesion." *Neuron* , 2007.
4. Lyskov S., Gray J.J. "The RosettaDock server for local protein-protein docking" *Nucleic Acids Research* 36 (Web Server Issue), W233-W238 (2008).
5. Phillips, JC, et al. "Scalable Molecular Dynamics with NAMD." *Journal of Computational Chemistry*, 2005.
6. Smith, M., Anne, S. M., & Flodman, P. (2009). Nuclear and Mitochondrial Genome Defects in Autisms. *The Year in Human and Medical Genetics* , 102-132.
7. Z Talebizadeh, Lam, D Y, M F Theodoro, D C Bittel, G H Lushington, and M G Butler. "Novel splice isoforms for NLGN3 and NLGN4 with possible implications in autism." *J Med Genet.*, 2006.
8. Yang Zhang. I-TASSER server

Conflicto de intereses: ninguno

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el M.J. Murdock Charitable Trust y donaciones privadas.