

FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM NEUROCIÊNCIAS

SILVANA DA CUNHA RUSSO

**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DAS INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE GPR3 E  
AGONISTAS INVERSOS**

Porto Alegre  
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA  
SAÚDE**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**SILVANA RUSSO**

**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DAS INTERAÇÕES MOLECULARES  
ENTRE GPR3 E AGONISTAS INVERSOS**

**Porto Alegre 2019**

**SILVANA RUSSO**

**SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DAS INTERAÇÕES MOLECULARES  
ENTRE GPR3 E AGONISTAS INVERSOS**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre pelo Programa  
de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da  
Saúde da Pontifícia Universidade Católica do  
Rio Grande do Sul.

**Orientador: Prof. Dr. ANDRÉ PALMINI**

**Porto Alegre 2019**



## Ficha Catalográfica

R969s Russo, Silvana da Cunha

Simulação Computacional das Interações Moleculares entre GPR3 e Agonistas Inversos / Silvana da Cunha Russo . – 2019.

65.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Andre Luis Fernandes Palmiini.

1. GPR3. 2. Doença de Alzheimer. 3. Receptores Ligados a Proteína G. 4. Neuroinflamação. 5. Canabidiol. I. Palmiini, Andre Luis Fernandes.  
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

“Uma mente que se abra a uma nova  
idéia jamais voltará ao tamanho original.”

Albert Einstein

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação a minha família, que sempre apoiou meu crescimento intelectual.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. André Palmimi, pela oportunidade que me ofereceu de trabalhar junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, e por ter me aceitado no mestrado.

Agradeço, também, ao Professor Dr. Walter Filgueira de Azevedo Junior, por ter aberto as portas do Laboratório de Bioquímica Estrutural.

Também gostaria de agradecer à minha família, pelo apoio incondicional.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>4</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>5</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	12
1.2. NEUROINFLAMAÇÃO.....	12
1.3. DOENÇA DE ALZHEIMER.....	13
1.4. GPCRs.....	14
1.5. GPR3.....	16
1.6. AGONISTAS INVERSOS DE GPR3.....	19
1.6.1. CANNABIDIOL.....	19
1.6.2. AF64394.....	21
1.7. MÉTODOS COMPUTACIONAIS.....	22
1.7.1. DOCKING MOLECULAR.....	23
1.7.2. MODELAGEM POR HOMOLOGIA.....	23
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
3.1. OBJETIVO PRIMÁRIO.....	26
3.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>

<b>4.1. OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS MODELOS DAS PROTEÍNAS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3. LOCALIZAÇÃO DO BOLSÃO DE LIGAÇÃO DE GPR3.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4. ESCOLHA DO PROTOCOLO DE DOCKING.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5. SIMULAÇÕES DE DOCKING COM GPR3 E GPR6.....</b>	<b>30</b>
<b>4.6. AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES MOLECULARES.....</b>	<b>30</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>5.1. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS MODELOS DAS PROTEÍNAS.....</b>	<b>32</b>
<b>5.2. LOCALIZAÇÃO DO BOLSÃO DE LIGAÇÃO DE GPR3.....</b>	<b>32</b>
<b>5.3. DOCKING MOLECULAR.....</b>	<b>35</b>
<b>5.4. AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES MOLECULARES.....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>40</b>
<b>8. ARTIGO APRESENTADO.....</b>	<b>49</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1. Estrutura de GPCR na membrana celular.</b>	<b>15</b>
<b>Figura 1.2. Representação Filogenética do grupo MECA.</b>	<b>17</b>
<b>Figura 1.3. Representação da expressão de GPR3, GPR6 e GPR12.</b>	<b>18</b>
<b>Figura 1.4. Atuação do Canabidiol.</b>	<b>20</b>
<b>Figura 1.5. Ligantes de GPR3, 6 e 12.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4.1. Canabidiol.</b>	<b>27</b>
<b>Figura 4.2. AF64394.</b>	<b>28</b>
<b>Figura 5.1. Gráfico de Ramachandran.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 5.2. Bolsão de ligação de GPR3, encontrado por PockDrug.</b>	<b>33</b>
<b>Figura 5.3. Bolsão de ligação de GPR3, calculado por sitehound.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 5.4. Estrutura de GPR3 ligada a canabidiol.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 5.5. Docking de canabidiol a GPR3 usando o programa MVD.</b>	<b>36</b>
<b>Figura 5.6. Ligações moleculares entre GPR3, GPR6 e canabidiol.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 5.7. Ligações moleculares entre GPR3 e canabidiol e AF64394.</b>	<b>37</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AR Receptores da Adenosina

CB1R Receptores Canabinóides 1

CB2R Receptores Canabinóides 2

DA Doença de Alzheimer

DAMP Moléculas com Padrão Molecular Associado A Dano

GPCRs Receptores Ligados a Proteína G

GPCRdb Banco de Dados de Receptores Acoplados a Proteína G

GPR3 Receptor Ligado a Proteína G Órfão 3

GPR3/6/12 GPR3, GPR6 e GPR12

PDB Protein Data Bank

LPAR1 Receptor do Ácido Lisofosfatídico 1

S1P1R Receptor da Esfingosina 1 Fosfato

SNC Sistema Nervoso Central

## RESUMO

As doenças neurodegenerativas são causas importantes de morbidade e mortalidade, principalmente entre a população idosa. Elas representam um grupo grande de doenças neurológicas, com padrões clínicos variados (ZUCHELLA et al., 2018). Os tratamentos existentes apenas oferecem melhora sintomática, mas não curam a doença (GAUTHIER et al., 2018). Vários alvos terapêuticos são propostos na investigação e tratamento das doenças neurodegenerativas. Entre o grande número de alvos moleculares, os Receptores Ligados a Proteína G (GPCR) compõe um grupo de moléculas muito estudado pela indústria farmacêutica e, atualmente, responsável pelo maior número de fármacos aprovados disponíveis no mercado (HUANG et al., 2017). Recentemente, o receptor órfão GPR3, que é um membro da família GPCR, porém, do qual ainda não se descobriu o ligante endógeno, tem recebido atenção nas pesquisas em Doença de Alzheimer (LAUN et al., 2018). Hoje se sabe que está expresso em grande quantidade no Sistema Nervoso Central (SNC), e a sua relação com doenças neurodegenerativas começou a ser evidenciada em pesquisas usando modelos de Doença de Alzheimer (THATHIAH et al., 2009). Estudos recentes desvendaram fármacos ligantes de GPR3 (JENSEN et al., 2014, LAUN; SONG, 2017). A investigação das interações moleculares de GPR3 com seus ligantes recém-descobertos poderia ajudar no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das doenças neurodegenerativas. A dificuldade na pesquisa dessas interações se relaciona a falta de uma estrutura tridimensional obtida por cristalografia de raios x de GPR3, fato que pretendemos contornar usando simulações computacionais. Os métodos computacionais são consagrados na pesquisa e desenvolvimento de fármacos porque trazem agilidade à pesquisa aliada a baixo custo.

Palavras-Chave: GPR3, Receptores Ligados a Proteína G, Doença de Alzheimer, Neurodegeneração, Neuroinflamação, Canabidiol.

## **ABSTRACT**

Neurodegenerative diseases are considered a burden to the ageing population. They represent a number of different pathologies which have different symptoms. (ZUCHELLA et al., 2018). Until now, there was no viable treatment, just ways to alleviate the symptoms. (GAUTHIER et al., 2018). In the research of neurodegenerative diseases, several molecular targets are proposed. Among them, the G Protein Coupled Receptors (GPCR) group has been widely studied by the pharmaceutical industry, with a significant number of drugs approved to treat human diseases (HUANG et al., 2017). Recently, the orphan receptor GPR3, from the GPCR family, for which no endogenous ligand has yet been found, has been researched in Alzheimer's Disease (LAUN et al., 2018). It is expressed broadly in the Central Nervous System, and its relation to neurodegenerative disease has been brought to light in Alzheimer's Disease model research (THATHIAH et al., 2009). Some studies had now discovered a few ligands to GPR3 (JENSEN et al., 2014, LAUN; SONG, 2017). The investigation of GPR3 molecular interactions with its newly found ligands could help in the development of new drugs to treat neurodegenerative diseases. The main challenge in this investigation is the lack of available 3D structure for GPR3, which we intend to address using computational simulations. Computational methods bring agility and affordability to drug development.

Key-Words: GPR3, G Protein Coupled Receptors, Alzheimer's Disease, Neurodegeneration, Neuroinflammation, Cannabidiol.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

As doenças neurodegenerativas, as quais se manifestam como demência e perda de memória nas últimas décadas de vida, têm sua origem bem antes. Pesquisas recentes, usando marcadores de neuroimagem, cognitivos, e biológicos, sugerem que alterações detectáveis precedem os sintomas em décadas (TOPIWALA et al., 2018). Com a passagem do tempo, há um acúmulo de mudanças responsáveis pelo aumento da susceptibilidade a doenças, que são consequências do envelhecimento. O cérebro é um órgão muito suscetível a essas mudanças.

Muitas doenças neurodegenerativas são causadas pela acumulação intracelular de vários agregados de proteínas. Esse evento geralmente coincide com neuroinflamação ou é precedido pela ativação de células imunes. Os mediadores inflamatórios podem causar dano a estruturas neuronais. Entretanto, parece mais provável que, antes de causar o dano estrutural, a inflamação piore a função dos neurônios. Pode-se hipotetizar que o dano funcional ou estrutural depende da concentração do mediador inflamatório respectivo, então o mesmo evento inflamatório poderia causar dano funcional e estrutural, dependendo, entre outras coisas, da distância até o sítio de liberação. Além do mais, o dano às estruturas neuronais pode ocorrer tanto no nível das sinapses ou no nível de redes neurais, dependendo da natureza, local, grau e duração da inflamação (ISING; HENEKA, 2018).

A característica dessas interações é a dobradura, agregação e deposição de proteínas no cérebro. Embora as proteínas agregadas e mal dobradas sejam únicas a cada patologia, as propriedades biofísicas dos agregados são conservadas. As proteínas mal dobradas adotam uma estrutura ordenada de polímero amiloide com propriedades tipo príon, que estão associadas com inflamação cerebral estéril (FRIEDLAND, 2017).

## 1.2. NEUROINFLAMAÇÃO

Os mecanismos inflamatórios na Doença de Alzheimer (DA) são uma área importante da pesquisa (WYSS-CORAY; ROGERS, 2012). Além dos achados patognomônicos da Doença de Alzheimer tais como as placas de amiloide beta, aglomerados neurofibrilares e degeneração neuronal, há evidência que mostra a neuroinflamação como importante na patologia da DA. Estudos neuropatológicos mostraram a presença de micróglia ativada e mediadores relacionados a inflamação nos cérebros com DA (SARLUS; HENEKA, 2017). Há evidência de que a patogênese na DA envolve o

compartimento neuronal e também os mecanismos imunológicos do cérebro. Os agregados de proteínas se ligam a receptores na micróglia e iniciam uma resposta imunológica, causando liberação de mediadores inflamatórios, que promovem a progressão da doença (HENEKA, 2015). A micróglia está distribuída no cérebro, e faz a vigilância quanto a presença de patógenos e debris, fazendo a manutenção do tecido. Quando ativada, a micróglia inicia a resposta imune lançando mediadores que podem causar lesão no tecido local (HENEKA, 2015).

Microglia e neuroinflamação são também associados com tau em DA. Microglia reativa pode produzir citocinas que levam a aumento na fosforilação do tau nos neurônios, o que pode acelerar o desenvolvimento da doença. Além disso, o tau mal dobrado pode levar a ativação microglial (GAUTHIER et al., 2018).

Avanços recentes indicam que as Moléculas com Padrão Molecular Associado A Dano (DAMP), que são liberadas por células lesadas, podem iniciar cascatas inflamatórias. A inflamação, desse modo, pode ser induzida de maneira endógena. Evidências de neuroinflamação podem mostrar a ativação de vias inflamatórias, com expressão aumentada de citocinas e lesão à integridade da barreira hematoencefálica, acompanhada por infiltração de células imunes periféricas. Doenças neurodegenerativas, incluindo DA, têm evidência de patologia neuroinflamatória (WILKINS et al., 2017).

### **1.3. DOENÇA DE ALZHEIMER**

A Doença de Alzheimer (DA) é caracterizada clinicamente por piora cognitiva global, declínio da memória, perda das atividades da vida diária, acumulação neural de tau e amiloide, e morte neuronal manifestada por atrofia em regiões cerebrais. Há um aumento na prevalência da DA, com uma projeção de que, por volta do ano 2050, aparecerá um novo caso de DA a cada 33 segundos, e perto de um milhão de novos casos ocorrerão anualmente nos Estados Unidos (SWANSON et al., 2018).

A prevalência da DA deve aumentar no futuro, levando em conta o envelhecimento da população (ZUCHELLA et al., 2018). Uma das mais comuns doenças neurodegenerativas crônicas, a DA se manifesta como demência em 60–80% dos casos. De um ponto de vista clínico, o declínio cognitivo e a mudança da personalidade, causada pela perda de neurônios, é evidente na DA e com 50 milhões de pessoas afetadas em 2016. A progressão da doença é reconhecida por uma queda gradual nas funções cognitivas, com sintomas tais como perda de memória e agressividade. Histopatologicamente, as características definidoras são os agregados intracelulares de amiloide beta e proteína tau hiperfosforilada, conhecidas como emaranhados neurofibrilares,

bem como neuroinflamação, no cérebro (WANG; MANDELKOW, 2016; WATT; KARL, 2017), o que leva a neurodegeneração e declínio cognitivo.

Tau é uma proteína essencial que promove a formação e estabilização dos microtúbulos, participando do desenvolvimento dos neurônios. Entretanto, em várias doenças neurodegenerativas, incluindo DA, tau passa por modificações patológicas nas quais a antes proteína solúvel passa a ter filamentos insolúveis, levando a falência dos neurônios (PÉREZ et al., 2018).

Os primeiros sinais de atofia aparecem no hipocampo e lobo parietal medial, com degeneração subsequente na região inferolateral do lobo temporal e do lobo frontal (SCAHILL et al., 2002, WEINTRAUB et al., 2012).

Alguns dos mecanismos propostos, que iniciariam esses efeitos patológicos, incluem o stress oxidativo (CASTELLANI, 2012), a resistência à insulina (Kuusisto, 1997) e a degradação mitocondrial (MOREIRA et al., 2010), que causa dano celular pela liberação de espécies reativas de oxigênio (BLOCK et al., 2007). Há necessidade de pesquisa para entender os padrões moleculares que ocorrem nos vários estágios de DA.

O tratamento da DA, atualmente, é apenas sintomático, e baseado na modulação de neurotransmissores, levando a alguma melhora clínica (GAUTHIER et al., 2018).

#### **1.4. GPCRs**

Os Receptores Ligados a Proteína G (GPCRs) representam a maior família de proteínas de membrana do genoma humano e são alvos importantes para a indústria farmacêutica (KOBILKA, 2007), sendo muito pesquisadas no desenvolvimento de fármacos devido a sua relevância fisiológica, pois são expressas na maior parte dos tecidos, estando envolvidas em aspectos da sua fisiologia. Também são facilmente acessíveis a fármacos através dos seus bolsões de ligação com propriedades físico-químicas favoráveis a ligações com vários tipos de moléculas. Muitos fármacos que visam os GPCR estão em desenvolvimento, em contrapartida, apenas poucos GPCR órfãos se encontram nesta situação, devido a menor conhecimento das suas funções fisiológicas (WACKER et al., 2017).

Os GPCRs são moléculas sinalizadoras versáteis, as quais regulam muitos processos em resposta a vários tipos de ligantes, fazendo transdução de sinais extracelulares das mais variadas categorias, como fótons, peptídeos, íons, hormônios, odores, para o interior da célula. A resposta intracelular é realizada por cascatas de segundo-mensageiros, controladas tanto por proteínas G, como por vias independentes das proteínas G, como por exemplo, a via das beta arrestinas. Os GPCR são um dos maiores alvos terapêuticos

atuais, com 30% das drogas colocadas no mercado atuando sobre GPCR (HAUSER et al., 2018).

Os GPCRs foram identificados em 1986. Há mais de 800 membros desta família no genoma humano, o que a torna a maior superfamília de receptores da superfície celular e também a maior família de proteínas em vertebrados. (DIXON et al., 1986). Mais de 370 destes GPCRs são de origem não sensorial, envolvidas em humor, cognição, dor e apetite. Quase 90% destes GPCRs podem se ligar a uma grande variedade de neurotransmissores e neuromoduladores no cérebro. (DOZE; PEREZ, 2012). Além disso, GPCRs, no cérebro, podem reagir a estímulos extracelulares e a alteração da sua função pode ser a causa da patogênese de várias doenças neurodegenerativas (HUANG et al., 2017).

Os GPCRs são subdivididos em cinco famílias, Glutamato, Rodopsina, Adesão, Frizzled e Secretina (FREDRIKSSON et al., 2003), e apresentam uma estrutura tridimensional conservada composta por sete hélices alfa transmembranares e uma oitava hélice intracelular, conectadas por três alças extracelulares e três alças intracelulares, com um terminal amino extracelular e um terminal carboxila intracelular (OLIVELLA et al., 2013).

Após o ligante interagir com o GPCR, ocorre o início de processo de ativação que depende de mudanças da estrutura tridimensional das sete hélices transmembranares do GPCR, que, na porção intracelular, estão ligados ao complexo da proteína G (EICHEL; VON ZASTROW, 2018).

Os detalhes relacionados ao reconhecimento de cada ligante pelo bolsão de ligação de diferentes GPCR têm sido estudados. A maior parte dos ligantes entra no bolsão de ligação dos GPCR através da porção extracelular. Alguns ligantes interagem com o bolsão de ligação geralmente fazendo contato com resíduos nas hélices 3, 5, 6 e 7. Ocorrem diferenças nos contatos com diferentes ligantes em relação a profundidade dentro do bolsão. Os GPCR que se ligam a lipídios não apresentam essa entrada do bolsão pelo meio extracelular, que se encontra fechada. A parte que está dentro da membrana apresenta um espaço maior entre as hélices para que o ligante possa entrar no bolsão através da membrana. Os GPCRs que se ligam a peptídeos apresentam um bolsão maior (ERLANDSON et al., 2018)

Os GPCR existem em várias conformações tridimensionais. Dependendo do ligante, há várias formas ativas. Essa característica possibilita que ligantes diversos levem a configurações tridimensionais diferentes dos GPCR (GUREVICH; GUREVICH, 2017).

Quando as GPCR são ativadas, dependendo de sua conformação, podem ativar seletivamente tanto as proteínas G, quanto as beta arrestinas, que, por sua vez, vão dar início a cascatas de sinalização distintas, com efeitos

fisiológicos diversos. Existem ligantes desenvolvidos para a ativação específica de uma dessas duas cascatas de sinalização (WANG et al., 2018).

Numerosos estudos mostraram evidências que implicam GPCRs na patogênese de DA (THATHIAH et al., 2013). Os GPCRs são proteínas de membrana prevalentes no SNC, dando origem a várias cascatas de sinalização celular. Thathiah mostrou que uma das vias da cascata de sinalização das GPCR, a via das beta-arrestinas 2 está superexpressa nos modelos de DA, causando uma elevação na produção do amiloide beta (THATHIAH et al., 2013). No cérebro com DA, o acúmulo de amiloide beta induz neuroinflamação através de sua ligação com numerosos receptores microgliais, incluindo os GPCR, que podem iniciar uma cascata inflamatória (MCGEER; MCGEER, 2013).

Muitos relatos descreveram a estimulação da produção de amiloide beta por vários GPCRs, incluindo o Receptor de Prostaglandina E2 (POOLER et al., 2004), o Receptor de Serotonina 2C (NITSCH et al., 1996), o Receptor do Hormônio Liberador de Tireotropina (PAGE, 2012) e o Receptor Alfa 2a Adrenérgico (CHEN et al., 2014). Thathiah mostrou que GPR3 estimulava a atividade da secretase gama, envolvida na geração e amiloide beta (THATHIAH et al., 2013).

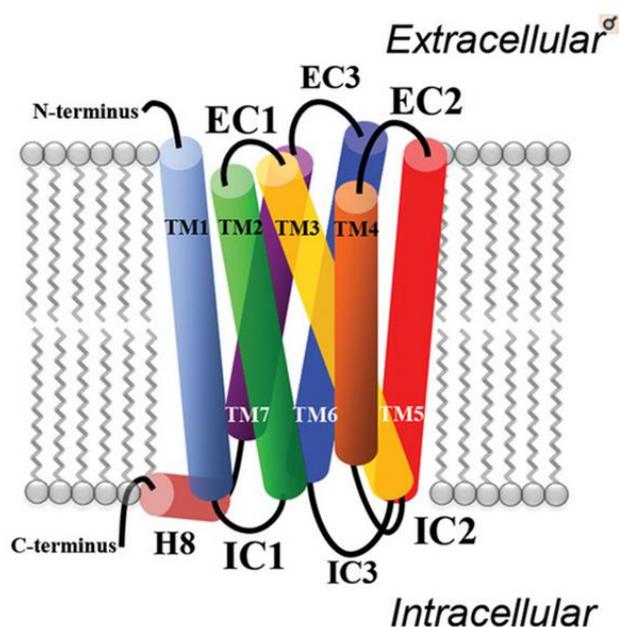


Figura 1.1. Estrutura de GPCR na membrana celular.

FONTE - MOBAREC, J.; FILIZOLA, M. Advances in the Development and Application of Computational Methodologies for Structural Modeling of G-Protein Coupled Receptors. Expert opinion on drug discovery, 3(3), 343-355. 2008.

## 1.5. GPR3

Os GPCRs órfãos são os GPCR para os quais ainda não foi descoberto nenhum ligante endógeno. Há quase 140 GPCRs órfãos. Apesar do avanço sofisticado do desenho de fármacos visando os GPCR, os receptores órfãos permanecem alvos farmacológicos menos populares (STOCKERT; DEVI, 2015). O receptor ligado a proteína G órfão 3 (GPR3) pertence a Classe A dos GPCRs e é altamente expresso nos neurônios do SNC. Entre outras funções, está provavelmente associado com diferenciação neuronal e maturação, e, recentemente, GPR3 foi relacionado a produção de Amiloide beta em neurônios (CAPALDI et al., 2018).

O GPR3 foi clonado em 1994 (MARCHESE et al., 1994), está localizado no cromossoma 1p35-1p36.1 (SONG et al., 1995), e é expresso nos neurônios de várias regiões cerebrais, incluindo o córtex, tálamo, hipotálamo, amígdala, hipocampo, glândula pituitária, e cerebelo (LAUN et al., 2018). O GPR3 está superexpresso em neurônios nas lâminas de tecidos de cérebros de pacientes com DA (HUANG et al., 2015).

O GPR3 forma, junto com GPR6 e GPR12, um subgrupo de GPCRs Classe A órfãos (GPR3/6/12) caracterizado por sua alta atividade constitutiva, ou seja, mantêm-se no estado ativado mesmo na ausência do ligante agonista (EGGERICKX et al., 1995). Por conta de suas relações filogenéticas, GPR3/6/12 foram classificados no grupo MECA dos GPCRs (FREDRIKSSON et al., 2003). Este grupo de receptores é formado pelos Receptores da Melanocortina (MCRs), pelos Receptores Lisofosfolípidicos: Esfingosina-1-Fosfato (S1P1R) e Ácido Lisofosfatídico (LPA1R), pelos Receptores Canabinóides (CBR), pelos Receptores da Adenosina (AR), e pelo subgrupo órfão GPR3/6/12. A maior similaridade de GPR3 é com GPR6 e GPR12. As sequências humanas destes três receptores contêm 330, 362, e 334 aminoácidos respectivamente, compartilhando 60% de identidade entre eles. Similaridades na sequência a nível transmembranar com outros GPCR incluem mais que 45% com o Receptor do Ácido Lisofosfatídico 1 (LPAR1) e com o Receptor da Esfingosina 1 Fosfato (S1P1R), e mais de 40% de homologia com os Receptores Canabinóides 1 e 2 (CB1R e CB2R) (MORALES et al., 2018). Esta percentagem alta de homologia com outros receptores que pertencem ao grupo MECA dos GPCRs, e que também são ativados por ligantes lipídicos, leva ao compartilhamento de achados estruturais específicos e à falta de motivos distintos quando comparados a outras subfamílias de receptores. Por exemplo, estes receptores não possuem um resíduo de prolina nos segmentos transmembranares da segunda e da quinta hélices, e têm apenas uma ponte dissulfídica na segunda alça extracelular. Os GPR3, GPR6 e GPR12 também contêm resíduos altamente conservados nas hélices transmembranares, tais como N1.50, D2.50, R3.50, W4.50, P6.50, e P7.50. Além disso, eles preservam os motivos específicos presentes nas alças transmembranares 3, 6 e 7, que

são os motivos DRY, CWXP, e NPXXY, respectivamente. Os papéis fisiológicos de GPR3, GPR6 e GPR12 são claros quando se considera sua alta concentração no SNC (EGGERICKX et al.,1995; HEIBER et al.,1995). GPR3 é altamente expresso em hipocampo, hipotálamo, córtex cerebral e cerebelo. (MORALES et al., 2018). O GPR3 altera comportamentos emocionais (Valverde, 2009), está envolvido com dor neuropática e regula antinocicepção induzida pela morfina (RUIZ-MEDINA et al., 2011).

O GPR3 aumenta o processamento da Proteína Precursora de Amiloide até o peptídeo tóxico Amiloide Beta através de mecanismos ainda desconhecidos. (NELSON; SHENG, 2013). GPR3 é único entre as GPCR no aumento da produção de Amiloide Beta (NELSON; SHENG, 2013).

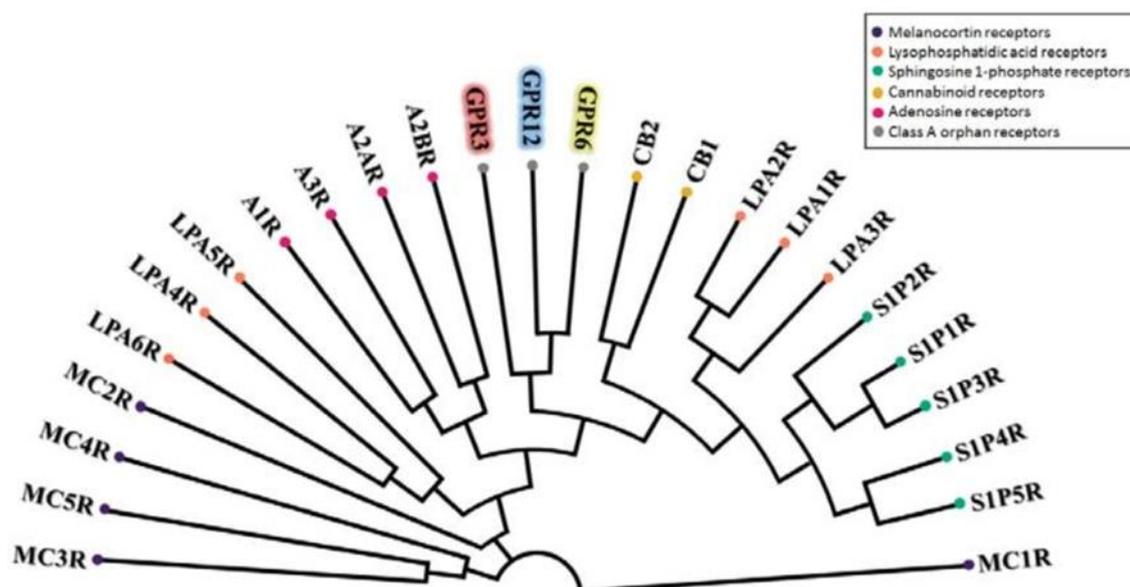


Figura 1.2. Representação Filogenética do grupo MECA. O subgrupo órfão GPR3/6/12 está evidenciado.

FONTE- MORALES, P.; ISAWI, I.; REGGIO, P. H. Towards a better understanding of the cannabinoid-related orphan receptors GPR3, GPR6 and GPR12. *Drug Metabolism Reviews*, 50(1), 74–93. 2018.

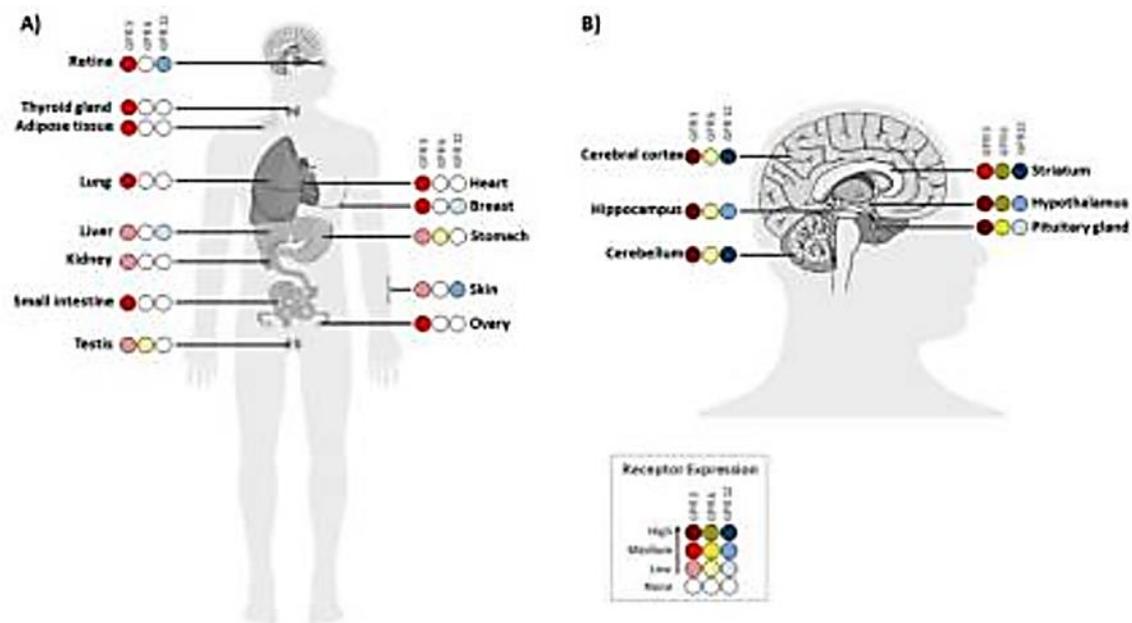


Figura 1.3. Representação da expressão de GPR3, GPR6 e GPR12. A) Expressão periférica; B) Expressão no SNC. GPR3 em vermelho, GPR6 em verde, GPR12 em azul. As cores mais escuras representam expressão mais alta.

FONTE- MORALES, P.; ISAWI, I.; REGGIO, P. H. Towards a better understanding of the cannabinoid-related orphan receptors GPR3, GPR6 and GPR12. *Drug Metabolism Reviews*, 50(1), 74–93. 2018.

O GPR3 tem atividade constitutiva e via de sinalização com a G proteína Gs, a qual ativa a enzima adenilil ciclase, aumentando o AMP cíclico intracelular. (EGGERICKX et al., 1995). A internalização ocorre durante a interação com a proteína beta arrestina 2, e através da via de sinalização ERK (LAUN et al., 2018).

Thathiah mostrou que GPR3 potencializa a atividade da secretase e estimula a produção de amiloide beta em neurônios (THATHIAH et al., 2009). Além disso, os pesquisadores acharam um efeito dose-dependente do gene de GPR3 na produção de amiloide beta, e os nocautes do gene mostraram redução nos níveis de amiloide beta.

O GPR3 modula a geração de amiloide beta e a função cognitiva in vivo. Os níveis de GPR3 estão elevados nos cérebros com DA. (HUANG et al., 2017). O nocaute de GPR3 em ratos com modelo de DA melhorava o déficit cognitivo desses animais e diminuía a quantidade de amiloide no cérebro (HUANG, et al., 2015).

Uma dificuldade para o estudo de GPR3 é que não existe ainda um modelo tridimensional dessa proteína disponível.

## **1.6. AGONISTAS INVERSOS DE GPR3**

O grupo GPR3/6/12 é ativo constitutivamente, resultando em níveis elevados de AMP cíclico (JENSEN et al., 2014). Os GPCRs mostram um espectro que vai de quiescência até atividade constitutiva, de acordo com as necessidades funcionais. Estudos biofísicos e bioquímicos confirmaram que o nível de atividade constitutiva mostrada pelos receptores individuais está relacionado a sua estrutura e é modulado pela força das interações entre os aminoácidos localizados no centro do receptor (WOOTEN et al., 2018).

A descoberta que os receptores podiam sinalizar na ausência do ligante ativador (agonista) levou ao entendimento de que existiriam ligantes que seriam capazes de reduzir essa atividade constitutiva espontânea. Como os agonistas possuem eficácia intrínseca, que é a habilidade de aumentar a atividade de um receptor, os agonistas inversos têm eficácia negativa intrínseca, ou seja, a habilidade de diminuir a atividade do receptor. A eficácia de um agonista por um receptor varia com a estrutura do agonista, podendo resultar em efeitos farmacológicos fortes ou fracos, então os agonistas inversos também apresentam graus diferentes de eficácia negativa, resultando em agonistas inversos fortes ou fracos (BERG; CLARK, 2018).

Na busca por agonistas inversos de GPR3, entre a variedade de fármacos canabinoides testados, o canabidiol (CBD), que vem a ser o maior componente não psicoativo da marijuana, reduziu fortemente o recrutamento de GPR3 e GPR6 pela via da beta arrestina 2. Além disso, os efeitos inibitórios de CBD no recrutamento da beta arrestina 2 foram concentração-dependente para ambos GPR3 e GPR6, com uma potência maior para GPR6 (LAUN et al., 2017).

Estes resultados mostraram, pela primeira vez, que tanto GPR3 como GPR6 são novos alvos moleculares para CBD, que age como um agonista inverso nestes receptores, e aponta que alguns dos efeitos terapêuticos do CBD, como na DA, podem ser mediados por estes receptores (LAUN et al., 2017).

Um estudo mostrou a inibição da via de sinalização da beta arrestina 2 pode diminuir a produção de amiloide beta e diminuir os déficits cognitivos na DA. Portanto, um agonista inverso de GPR3 poderia trazer benefícios nesta relação. (THATHIAH et al., 2009).

### 1.6.1. CANABIDIOL

O canabidiol (CBD) é o maior componente não psicoativo da marijuana, o qual demonstrou propriedades neuroprotetoras, anti-inflamatórias e antioxidantes *in vitro* (WATT; KARL, 2017), por este motivo é investigado como tratamento potencial para DA. O perfil de segurança do CBD foi descrito por Bergamaschi. Doses de até 1500mg por dia são bem toleradas em humanos, com poucos efeitos adversos. (BERGAMASCHI et al., 2017). Há, porém, poucos testes clínicos sobre eficácia e CBD na DA, apesar de várias evidências experimentais mostrarem o efeito da CBD em vários processos moleculares relacionados à DA. Foram demonstrados alguns efeitos do CBD relacionados a neuroproteção (SUN et al., 2017). O CBD diminuiu a hiperfosforilação de tau (ESPOSITO et al., 2006). Estudos em ratos mostraram diminuição da neuroinflamação, com diminuição da gliose e estímulo a neurogênese (ESPOSITO et al., 2011). Há evidências de que o CBD diminui a morte neuronal induzida por amiloide beta (IUVONE et al., 2004). O CBD reduz a neuroinflamação e promove neurogênese no hipocampo (ESPOSITO et al., 2011), bem como reduz o stress oxidativo em neurônios (IUVONE et al., 2004).

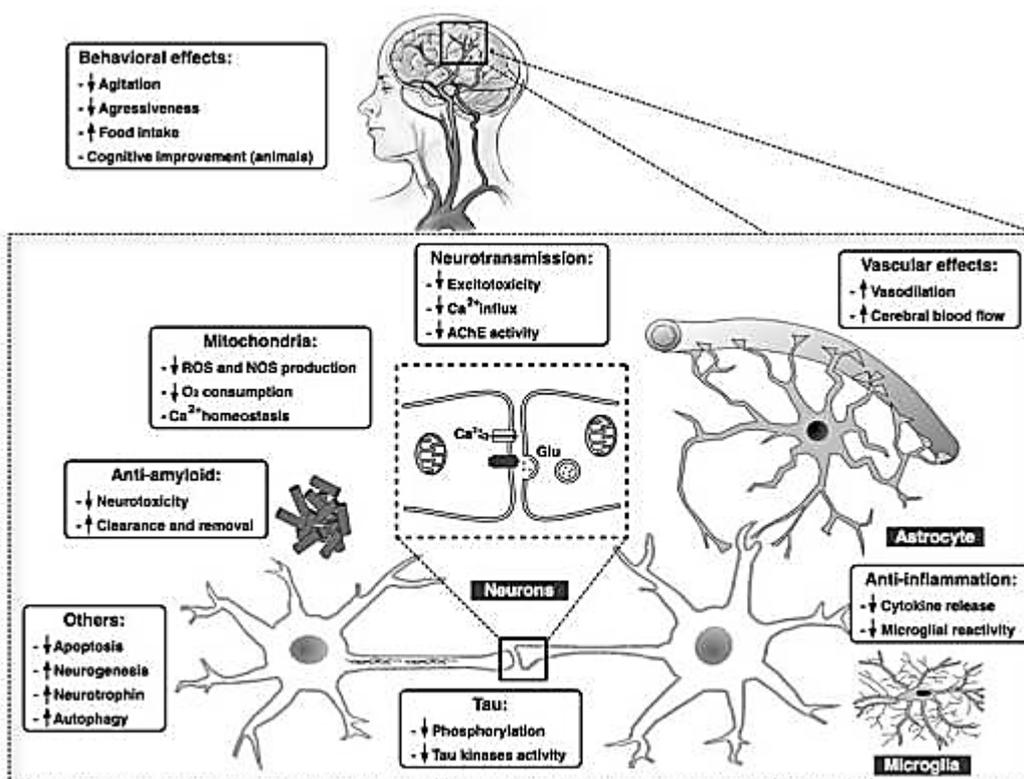


Figura 1. 4. Atuação do Canabidiol. O CBD pode atuar em vários processos relacionados à patogênese da DA, incluindo o processamento anormal de amiloide beta e proteína tau, neuroinflamação e stress oxidativo.

FONTE- ASO, E.; FERRER, I. Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic. *Frontiers in pharmacology*, 5, 37. 2014.

Estudos em pacientes com epilepsia severa mostram a diminuição do número de episódios de convulsões nos grupos usando canabidiol (DEVINSKY et al., 2016). O CBD tem atraído interesse devido aos relatos de diminuição significativa no número e severidade de convulsões nos pacientes portadores das síndromes de Dravet e Gaston-Leroux (DEVINSKY et al., 2014).

O CBD diminuiu o recrutamento de beta arrestina 2 a GPR3 na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Também diminuiu o recrutamento de beta arrestina 2 a GPR6 na concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  (LAUN et al., 2017). Laun demonstrou, pela primeira vez, que o CBD é um agonista inverso de GPR3 e GPR6. CBD demonstrou ter potencial terapêutico para um grande número de disfunções neurológicas. Esses achados indicam que alguns dos efeitos benéficos do CBD em relação a DA podem ser mediados por GPR3.

#### **1.6.2. AF64394**

Jensen identificou o composto [1,2,4] triazolo [1,5-a] pirimidina como agonista inverso de GPR3. Uma manipulação desse composto, através da introdução de um grupo 2-i-propoxi, aumentou a potência do fármaco, e esta foi chamada de AF64394. O efeito foi seletivo em relação a GPR3, apresentando inibição 30x maior do que a GPR6 (JENSEN et al., 2014).

Summary of GPR3/6/12 ligands and their functionality.

Ligands	Functionality			Functional Readout	References
	GPR3	GPR6	GPR12		
DPI	Agonist*	NA	NA	cAMP accumulation	(Ye et al. 2014)
				$\beta$ -arrestin2 recruitment	
				Ca <sup>2+</sup> mobilization	
AF64394	Inverse agonist**	Inverse agonist*	Inverse agonist*	cAMP accumulation	(Jensen et al. 2014)
CBD	Inverse agonist*	Inverse agonist*	NR	$\beta$ -arrestin2 recruitment	(Laun and Song 2017)
	NR	NR	Inverse agonist*	cAMP accumulation	(Brown et al. 2017)
415	NR	Inverse agonist**	NR	cAMP accumulation	(Hitchcock et al. 2014)
494	NR	Inverse agonist**	NR	cAMP accumulation	(Hitchcock et al. 2014)
633	NR	Inverse agonist**	NR	cAMP accumulation	(Hitchcock et al. 2014)
5	NR	Inverse agonist**	NR	cAMP accumulation	(Hitchcock et al. 2015)
47	NR	Inverse agonist*	NR	cAMP accumulation	(Brown et al. 2015)
25	NR	Inverse agonist*	NR	cAMP accumulation	(Adams et al. 2015)
ARE111	NR	Inverse agonist*	NR	cAMP accumulation	(Beeley et al. 2001)
				GTP $\gamma$ binding	
ARE112	NR	Inverse agonist*	NR	cAMP accumulation	(Beeley et al. 2001)
				GTP $\gamma$ binding	
ARE133	NR	Inverse agonist**	NR	cAMP accumulation	(Beeley et al. 2001)
				GTP $\gamma$ binding	
ARE136	NR	Inverse agonist**	NR	cAMP accumulation	(Beeley et al. 2001)
				GTP $\gamma$ binding	
Tyrosol	NR	NR	Agonist**	cAMP accumulation	(Lin et al. 2008)

NA: No activity found at the concentrations tested; NR: Non-reported;

\*Potency in the micromolar range;

\*\*Potency in the nanomolar range.

Figura 1.5. Ligantes de GPR3, 6 e 12.

FONTE- MORALES, P.; ISAWI, I.; REGGIO, P. H. Towards a better understanding of the cannabinoid-related orphan receptors GPR3, GPR6 and GPR12. Drug Metabolism Reviews, 50(1), 74–93. 2018.

## 1.7. MÉTODOS COMPUTACIONAIS

O desenvolvimento de técnicas computacionais tem se tornado importante na pesquisa farmacológica. Essas abordagens permitiram muitas histórias de sucesso na descoberta de fármacos novos. Os equipamentos mais

acessíveis permitem o desenvolvimento de simulações que diminuem o custo e aceleram a pesquisa farmacológica. O sequenciamento do genoma humano trouxe novos alvos terapêuticos. A cristalografia por raios X é um método que se popularizou, vem crescendo atualmente, e que permite a obtenção da estrutura tridimensional da proteína alvo, podendo esta estar complexada a um ligante, desta forma permitindo a análise das interações químicas e morfológicas entre eles, tarefa esta facilitada com a utilização dos métodos computacionais.

### **1.7.1. DOCKING MOLECULAR**

O método mais popular no desenho de fármacos baseado em estrutura é o docking molecular. No método de docking molecular, são geradas computacionalmente várias possibilidades de encaixe do ligante na proteína, permitindo a avaliação de suas propriedades estruturais e químicas, tais como, geometria, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. A posição cristalográfica do ligante é usada para alimentar o algoritmo de busca e determinar se este algoritmo de docking molecular é capaz de recuperar computacionalmente a posição cristalográfica do ligante. Também é possível modelar mudanças na geometria interna dos alvos que ocorrem quando o complexo proteína-ligante é formado (DE RUYCK et al., 2016), como também testar novos ligantes. A ligação do fármaco com a proteína é um passo importante nas reações enzimáticas. Um entendimento detalhado das interações entre ligantes e proteínas forma a base do desenho de fármacos. Diz-se que, em média, um fármaco se liga a seis alvos diferentes, incluindo o alvo primário e não-alvos adicionais (MESTRES et al., 2009). O entendimento das particularidades de cada ligante com seu alvo permite que se desenhe fármacos mais específicos e seguros, com menor número de efeitos adversos.

### **1.7.2. MODELAGEM POR HOMOLOGIA**

Quando não se dispõe da estrutura tridimensional da proteína de interesse através da cristalografia por raios x, pode-se fazer um modelo desta por homologia. Para fazer um modelo por homologia, deve-se ter uma similaridade de sequência entre a proteína de interesse e outra proteína homóloga cuja estrutura foi resolvida pela cristalografia por raios x, da ordem de 30%, para que se obtenha acurácia na obtenção do modelo (KUFAREVA et al., 2011; BEUMING; SHERMAN, 2012; KATRITCH et al., 2012). A modelagem por homologia é um método de predição de estrutura popular na obtenção de coordenadas 3D das estruturas. Sabe-se que a estrutura das proteínas se mantém mais conservada do que a sua sequência, durante a evolução. A base da modelagem por homologia é o fato que as proteínas evolucionariamente relacionadas mantêm estruturas similares. Conhecendo-se estruturas que têm sequências de aminoácidos semelhantes à sequência do alvo de interesse, há maior facilidade na predição da estrutura, função do alvo e, talvez, seus sítios e

modos de ligação. Outra abordagem é o uso de múltiplos moldes, que permitem a modelagem de regiões no GPCR órfão baseado na maior identidade entre as sequências, criando um molde-quimera (NGO et al., 2016). Na modelagem por homologia, a primeira tarefa é achar a estrutura homóloga à sequência de interesse. Para isso, a sequência é comparada contra um banco de dados de proteínas, onde as estruturas tridimensionais são conhecidas. A Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990) é uma das mais populares ferramentas de alinhamento de sequências usada para busca e similaridade. Uma vez que uma proteína homóloga é identificada, a construção do modelo para a sequência alvo é feita usando algoritmos de modelagem por homologia (LEELANANDA; LINDERT, 2016).

Os GPCRs estão entre as maiores famílias de proteínas de membrana integrais na pesquisa, sendo alvos farmacológicos tão importantes que vários modelos dos GPCR por homologia foram construídos (CLARK, 2017). Embora metade dos fármacos atualmente no mercado têm GPCR como alvo, apenas 10% destes receptores têm ligantes endógenos (MOBAREC; FILIZOLA, 2008; JAZAYERI et al., 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA

A doença de Alzheimer é uma doença prevalente e incapacitante, para a qual não existe tratamento. A pesquisa na DA tem evidenciado vários alvos moleculares passíveis de investigação, com o objetivo de se achar um alvo farmacológico.

O GPR3 é uma proteína pouco estudada e que recentemente teve seu papel na Doença de Alzheimer descoberto.

Mais recentemente foram descobertos ligantes dessa proteína. O estudo da interação de GPR3 com seus ligantes poderia trazer conhecimentos que levem a formulação de fármacos eficientes para a DA.

A simulação computacional das interações químicas entre a proteína GPR3 e seus ligantes é um método acessível para a pesquisa farmacológica.

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO PRIMÁRIO**

Observar o modo de ligação de GPR3 com seus ligantes e identificar os achados estruturais e químicos importantes.

#### **3.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

Definir o bolsão de ligação de GPR3;

Simular computacionalmente a interação proteína-ligante por meio de docking molecular;

Avaliar as interações moleculares importantes de GPR3 com seus ligantes.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS LIGANTES E DO MODELO POR HOMOLOGIA

A construção do modelo por homologia, nas proteínas de membrana, é um desafio, já que boa parte das estruturas não tem identidade suficiente com os modelos disponíveis na base de dados do Protein Data Bank (PDB) (BERMAN et al., 2000), e também devido à dificuldade intrínseca desta classe de proteínas de ter a sua estrutura resolvida pela cristalografia por raios X (REDDY et al., 2006). A modelagem por homologia é feita por comparação de duas ou mais proteínas de uma mesma família que possuem sequências de aminoácidos similares. Então, espera-se que tenham estrutura tridimensional semelhante. De maneira geral, é aceito ao redor de 30% de identidade na sequência, para que haja uma predição segura da estrutura. Para o modelamento por homologia existem diversos protocolos, por exemplo: alinhamento de sequência, protocolos de construção de estruturas, algoritmos tipo loop-building (REDDY et al., 2006).

Além das estruturas de proteínas disponibilizadas no PDB, grupos de pesquisa disponibilizam estruturas de modelos construídos por homologia. Nós baixamos a estrutura das proteínas GPR3 e GPR6 do Banco de Dados de Receptores Acoplados a Proteína G (GPCRdb), um banco de dados de estruturas de proteínas muito conhecido na comunidade de pesquisadores, GPCRdb foi iniciado em 1993 por Gert Vriend, Ad IJzerman, Bob Bywater e Friedrich Rippmann (MUNK et al., 2016). Os modelos de GPR3 e GPR6 foram construídos tendo por base a estrutura cristalográfica depositada no PDB da proteína Receptor da Esfingosina 1 Fosfato (S1P1R), sob o código 3V2Y, com a qual possuem uma similaridade de 28%.

O ligante canabidiol foi baixado do banco de dados Zinc (IRWIN; SHOICHET, 2005). O ligante AF64394 foi desenhado no programa Marvin JS da ChemAxon, conforme as informações constantes no trabalho de Jensen 2014 (JENSEN et al., 2014).

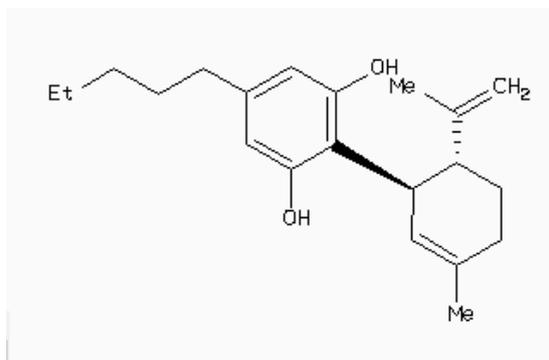


FIGURA 4.1. canabidiol

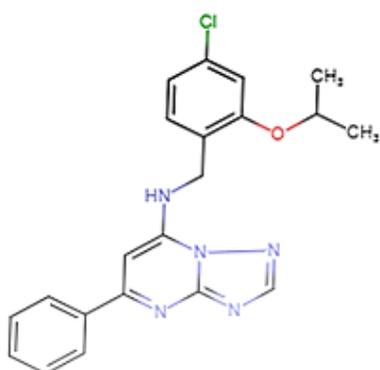


FIGURA 4.2. AF64394

#### 4.2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS MODELOS DAS PROTEÍNAS

O programa PROCHECK é utilizado na avaliação dos parâmetros estereoquímicos, dos comprimentos das ligações químicas, dos ângulos, dos planos, da quiralidade, das conformações e da planaridade das cadeias laterais, da planaridade das ligações peptídicas, dos ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais, e do impedimento estérico entre pares de átomos não-ligados (LASKOWSKI; SWINDELLS, 1993). A qualidade do modelo é dada pelo gráfico de Ramachandran, o qual define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis ou desfavoráveis (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968).

#### 4.3. LOCALIZAÇÃO DO BOLSÃO DE LIGAÇÃO DE GPR3

A predição da localização do bolsão de ligação é um passo fundamental na investigação do mecanismo de reconhecimento molecular e da função da proteína. Os parâmetros usados para inferir a localização de possíveis bolsões de ligação são: a estrutura da proteína, sua sequência de aminoácidos e informações do ligante. O mesmo bolsão de ligação pode se ligar a ligantes quimicamente diferentes, com tamanhos e propriedades físico-químicas distintas, e o mesmo ligante pode se ligar a diversos bolsões de ligação (AN et al., 2005).

Os bolsões de ligação para as moléculas dos ligantes são geralmente 40% maiores que o tamanho do ligante (AN et al., 2005). O bolsão de ligação é definido como todo o conjunto de aminoácidos dentro de um raio de 4 Angstroms do ligante. Um arranjo específico de aminoácidos controla o

reconhecimento do ligante, através de complementaridade eletrostática e de forma (KAHRAMAN et al., 2007). Os bolsões de ligação tendem a ter um grau maior de conservação, permitindo a predição do bolsão de ligação (CAPRA et al., 2009).

O reconhecimento das moléculas pela proteína é um tema importante e primário nos processos biológicos celulares. A função de uma proteína se dá por suas interações com outras moléculas. O processo de reconhecimento é baseado principalmente em complementaridade eletrostática e de forma. Os bolsões de ligação que se unem a um mesmo ligante apresentam variações na morfologia (KAHRAMAN et al., 2007).

Uma limitação no estudo de GPR3 é que não se conhece a localização de seu bolsão de ligação com os ligantes. Há métodos de predição dessa localização que não são guiados por informações do ligante, e sim por informações geométricas do receptor usando poliedros, dessa maneira extraindo todos os possíveis bolsões da proteína usando esferas de vários diâmetros (LE GUILLOUX et al., 2009). Além disso, predizer a probabilidade do bolsão de se ligar com pequenas moléculas, é de interesse farmacológico.

Enquanto alguns métodos se baseiam em características geométricas, outros usam cálculos de energia. Estes últimos descrevem as interações moleculares da superfície do bolsão, ou identificam as cadeias laterais dos resíduos que estejam em conformações com alta energia, que tendem a corresponder a resíduos importantes (GHERSI; SANCHEZ, 2009). Sitehound identifica diferentes tipos de bolsões de ligação dependendo do sensor usado para cálculos. A função molecular de uma proteína é determinada por interações com outras moléculas no bolsão de ligação. Os tipos de sensores utilizados no método são: carbono, que identifica sítios de ligação para moléculas que interagem através de contatos de van der Waals; fosfato, que é usado para identificar ligantes fosforilados; oxigênio-hydroxila, que caracteriza ligações com açúcar (HERNANDEZ et al., 2009).

#### **4.4. ESCOLHA DO PROTOCOLO DE DOCKING**

Usamos o programa Molegro Virtual Docker (MVD) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006), para a escolha do protocolo de docking mais apropriado, e a estrutura 3V2Y obtida por cristalografia por raios x de S1P1R, o receptor com maior similaridade a GPR3 encontrado no PDB, em complexo com seu antagonista ML056. (HANSON et al., 2012). Procuramos reproduzir a posição cristalográfica do ligante ML056 de S1P1R na estrutura 3V2Y (STANLEY et al., 2016), usando os protocolos disponíveis no programa MVD. O protocolo escolhido, que apresentou os melhores resultados, utilizou Plants Score como função score e como algoritmo de busca, utilizou MolDock Simplex

Evolution. A semente aleatória foi 1407176675. O desvio médio quadrático (RMSD) resultante foi 0,77 Å (HEBERLE; DE AZEVEDO, 2011).

#### **4.5. SIMULAÇÕES DE DOCKING COM GPR3 E GPR6**

Utilizamos o protocolo de docking selecionado anteriormente no MVD para realizar as simulações de docking. As simulações feitas utilizaram a proteína GPR3 e seu agonistas inversos canabidiol e AF64394. Usamos, também, a proteína homóloga GPR6 e seu agonista inverso canabidiol, para fins comparativos.

#### **4.6. AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES MOLECULARES**

As interações proteína-ligante são, geralmente, não covalentes, para permitir sua reversibilidade. Os tipos de interações moleculares mais comuns são os contatos hidrofóbicos, presentes em 99% dos complexos, e ligações de hidrogênio, presentes em 77% (SALENTIN et al., 2014). O conhecimento sobre a abundância, contribuições de energia e regras de formação das interações moleculares, é essencial para que se faça os perfis de interação.

As interações hidrofóbicas são formadas de agregados de moléculas hidrofóbicas em solução aquosa com o objetivo de reduzir a sua superfície exposta à água, geralmente localizadas no interior do bolsão de ligação. As ligações de hidrogênio são consideradas as mais importantes das interações não covalentes (SALENTIN et al., 2014). Apesar de sua força e seletividade, não são essenciais para que haja ligação de alta afinidade (SALENTIN et al., 2014). Na ligação covalente, os átomos compartilham elétrons de sua última camada. A força dessa ligação é maior do que nas não covalentes, na qual não há esse compartilhamento, até por causa da necessidade de reversibilidade da interação.

O programa LigPlot (WALLACE et al., 1995) usa as coordenadas 3D do complexo proteína ligante e evidencia as interações moleculares de cada resíduo da proteína com seu ligante, categorizando, ainda, as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). Os resíduos equivalentes de proteínas homólogas são evidenciados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS MODELOS

Usando o programa Procheck, obtivemos o seguinte resultado, conforme a figura:

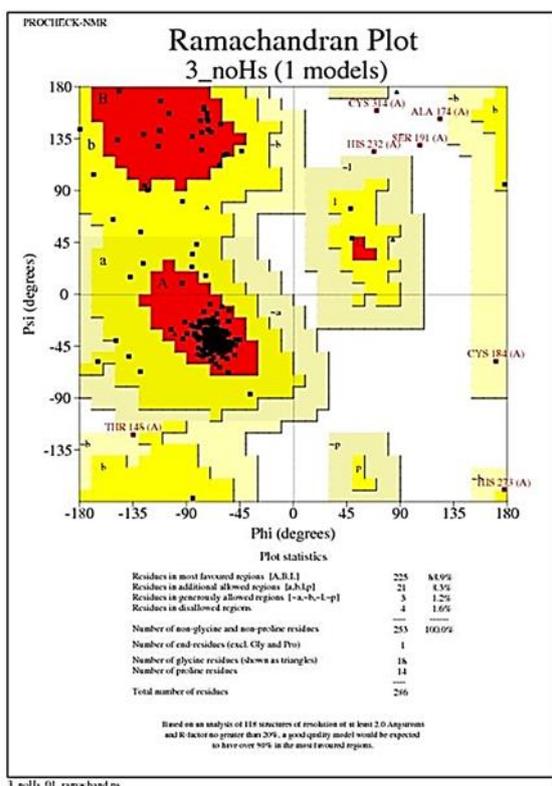


Figura 5.1. Gráfico de Ramachandran

FONTE- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J. M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. App. Cryst., 26, 283-291. 1993.

Resultado- Dos 286 resíduos encontrados, 98,4 % estavam nas áreas mais favoráveis, e apenas 1,6% estavam em áreas não permitidas, mostrando a boa qualidade do modelo.

## 5.2. LOCALIZAÇÃO DO BOLSÃO DE LIGAÇÃO DE GPR3

Usamos PockDrug (HUSSEIN et al., 2015), para identificar o mais provável bolsão de ligação, conforme a figura 5.2.

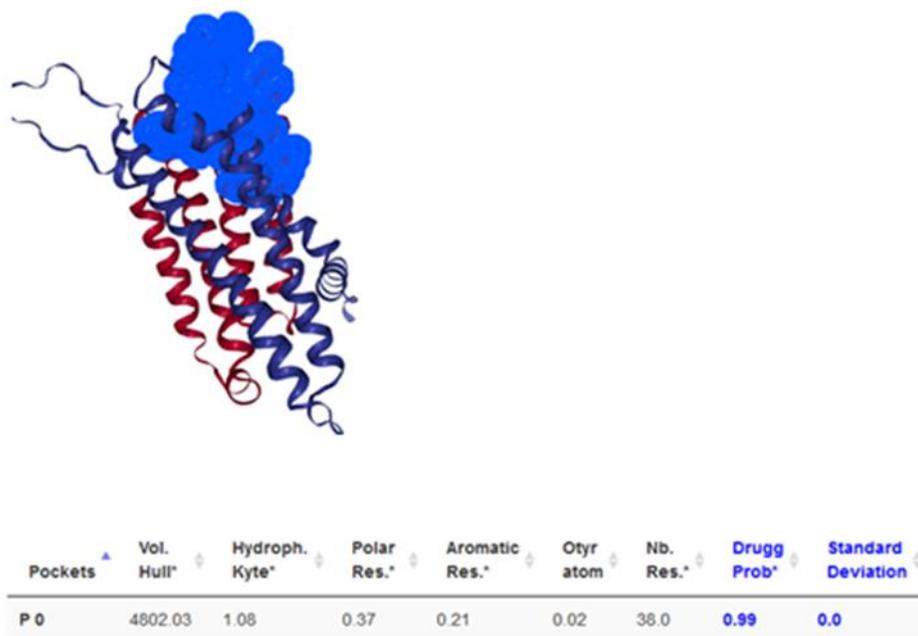
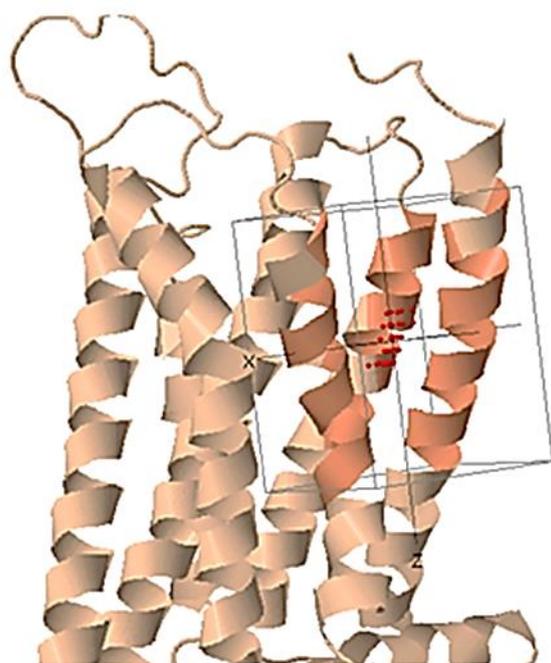


FIGURA 5.2. Bolsão de ligação de GPR3, encontrado por PockDrug, com índice de drogabilidade de 0,99. Engloba, principalmente, as hélices transmembranares 1, 2 e 7.

FONTE- HUSSEIN, H. A.; BORREL, A.; GENEIX,C.; PETITJEAN,M.; REGAD, L.; CAMPROUX, A.C. PockDrug-Server: a new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins. Nucl. Acids Res. May 8, 2015.

O método PockDrug mostrou o bolsão de ligação mais provável na região próxima à extracelular, entre as hélices 1, 2 e 7.

Usando Sitehound, (HERNANDEZ et al., 2009), identificamos um bolsão de ligação superponível ao encontrado pelo método geométrico anterior, conforme a figura. A localização do bolsão de ligação se assemelha ao achado por outro grupo (MORALES et al., 2017). Sitehound é um método de predição de sítios de ligação da proteína com o ligante, determinando regiões que apresentam energia ótima para a ligação, usando sondas de carbono para localizar sítios de ligação possíveis, e uma sonda fosfato, que localiza sítios com grupos fosfato (GHERSI; SANCHEZ, 2009).



Jmol

#### Box Center ?

Click in Applet  
 Residue number = "47;" use  
 Coordinates

X  Y  Z

#### Box Dimensions ?

X   
 Y   
 Z

**Residues of X(,) within 5 angstroms to box center:**  
 LEU 47. SER 50. GLY 51. LEU 93. THR 287

FIGURA 5.3. Bolsão de ligação de GPR3, calculado por sitehound, com as coordenadas moleculares do centro e os resíduos importantes.

FONTE- HERNANDEZ, M.; GHERSI, D.; SANCHEZ, R. Sitehound-web: a server for ligand binding site identification in protein structures. Nucleic acids research, 37(Web Server issue), W413-6. 2009.

A localização espacial do bolsão de ligação de GPR3 não é conhecida, devido a ausência de uma estrutura tridimensional desta proteína. No entanto, a nossa simulação mostrou achados que são compatíveis com os dados experimentais disponíveis. Existem algumas características encontradas no modelo de GPR3 que são semelhantes àquelas encontradas na estrutura tridimensional da proteína homóloga S1PR1, que teve sua estrutura resolvida, as quais são relacionadas com as suas propriedades de ligação a lipídios, tais como a oclusão da parte extracelular que daria acesso ao bolsão de ligação, pelo terminal amino. Além disso, as hélices 1 e 2 estão desviadas na direção da hélice 3, deixando uma abertura maior entre as hélices 1 e 7. Esses achados estruturais permitem a hipótese de que o ligante primeiro teria que ser

depositado no folheto externo da membrana, e aí se mover lateralmente para ganhar o acesso ao bolsão de ligação (PULKOSKI-GROSS et al., 2015).

O processo de ligação, através da membrana bilipídica, de ligantes lipídicos, a uma proteína alvo, é pouco compreendido. A ligação do inibidor ML056 a S1P1R é desvendada com a resolução da estrutura do complexo 3V2Y (STANLEY et al., 2016). A via de entrada consiste na difusão deste ligante na camada bilipídica até atingir um vestíbulo na membrana, no topo da hélice 7, e daí, se mover até a cavidade do bolsão de ligação, através de um canal formado pelas hélices 1 e 7, e pelo terminal amino (STANLEY et al., 2016). Nossos dados são compatíveis com estes achados, ao colocar o bolsão de ligação próximo a parte extracelular da membrana, e numa cavidade formada pelas hélices 1, 2 e 7.

### 5.3. DOCKING MOLECULAR

Usamos o programa MVD para realizar o docking entre os ligantes e GPR3. A partir das coordenadas de localização atômicas encontradas pelo método anterior, Sitehound, que foram  $X=0,21$ ,  $Y=11$ , e  $Z=-0,992$ , referentes ao centro geométrico do bolsão de ligação que foi encontrado pelo programa, definimos os parâmetros das coordenadas da esfera do bolsão de ligação, utilizando para o docking o protocolo Plants Score como função score e como algoritmo de busca, foi usado MolDock Simplex Evolution, que foi o protocolo com melhor performance quando utilizado na estrutura da proteína homóloga S1P1R, complexada com seu ligante ML056, na estrutura 3V2Y, baixada do PDB. A semente aleatória foi 1407176675.

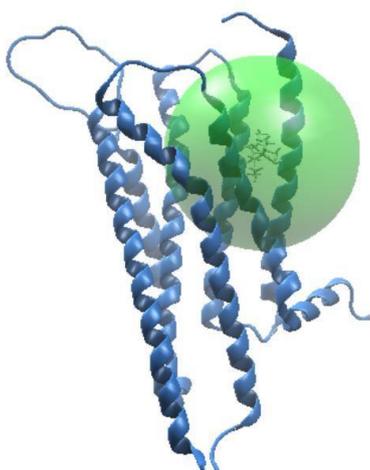


FIGURA 5.4. Estrutura de GPR3 ligada a canabidiol. Pode-se ver as 8 hélices da proteína, bem como suas 3 alças extracelulares e 3 alças intracelulares, presentes em todo o grupo dos Receptores Ligados à Proteína G (GPCR). Figura gerada com o programa MVD.

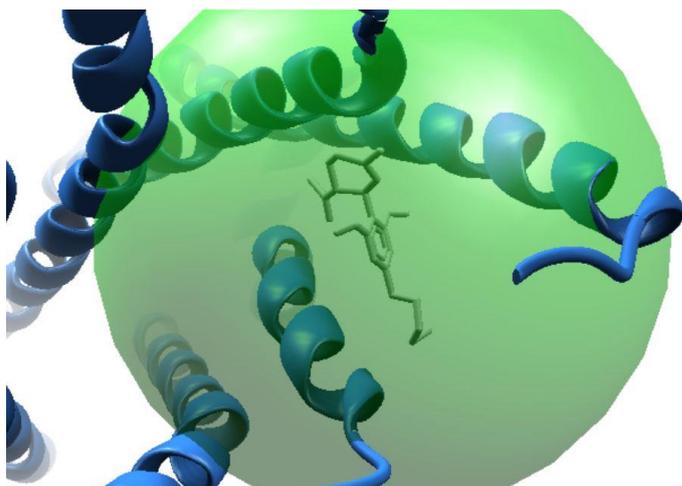


FIGURA 5.5. Docking de canabidiol a GPR3 usando o programa MVD, o protocolo Plants Score como função score e MolDock Simplex Evolution como algoritmo de busca. Pode-se observar a relação do ligante com as hélices 1, 2 e 7. Figura gerada com o programa MVD.

#### 5.4. AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES MOLECULARES

Utilizamos o programa LIGPLOT (WALLACE et al.,1995) para avaliar as interações moleculares entre GPR3 e seus ligantes canabidiol e AF64394. Evidenciamos os aminoácidos que estão presentes na interação molecular, seja participando de ligações de hidrogênio ou em contatos de Van der Waals, e indicando os resíduos-chave responsáveis pela especificidade da interação de GPR3 com seus ligantes.

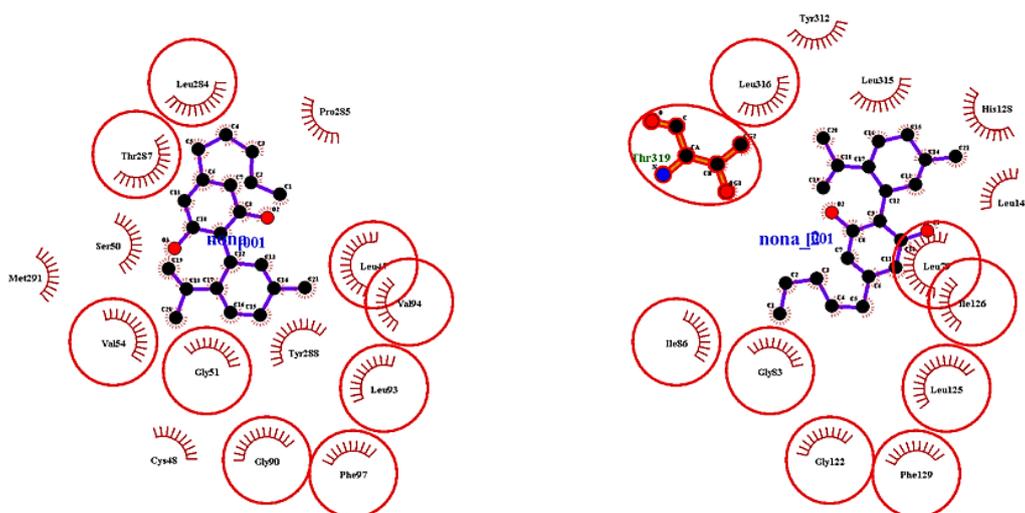


FIGURA 5.6. Interações intermoleculares entre GPR3 e canabidiol à esquerda e GPR6 e canabidiol à direita. Figura gerada com o programa LigPlot.

Podemos observar os resíduos de aminoácidos circutados em vermelho, que correspondem aos resíduos que participam na ligação das duas proteínas homólogas GPR3 e GPR6 com canabidiol. Os números referente a posição na cadeia, que estão diferentes, são devido a diferença na quantidade total de aminoácidos de cada proteína, mas são considerados resíduos equivalentes no bolsão de ligação. Podemos ver que há 14 ligações de van der Waals entre GPR3 e canabidiol, e 12 destas ligações com GPR6. Também percebemos que, em comum, a existência de 8 aminoácidos importantes, que participam da interação proteína-ligante nas duas proteínas, fazendo ligações de van der Waals. Também, podemos notar que GPR6 e canabidiol fazem uma ligação de hidrogênio em Thr 319, que não se observa em GPR3, o que pode explicar a afinidade maior de GPR6 por canabidiol em relação a GPR3 (LAUN et al., 2017).

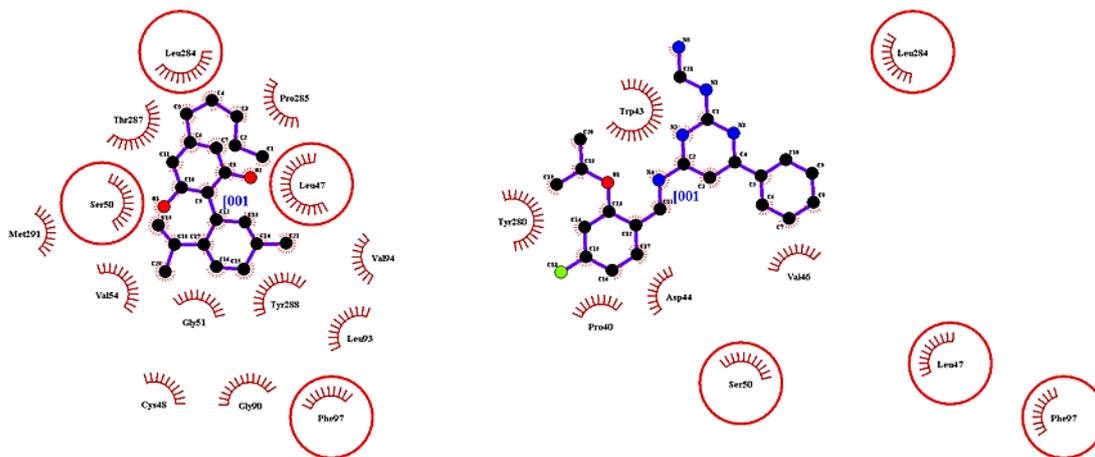


FIGURA 5.7. Ligações moleculares entre GPR3 e canabidiol à esquerda e GPR3 e AF64394 à direita. Figura gerada com o programa LigPlot.

Se, na ligação com canabidiol, GPR3 apresentava 14 resíduos interagindo, com AF64394 estes são em menor número, totalizando nove resíduos. Desses resíduos, Leu47, Ser50, Phe97 e Leu 284 são importantes na interação de GPR3 com os dois ligantes, canabidiol e AF64394. Também podemos notar que os últimos três resíduos mencionados, Leu47, Phe97 e Leu 284, também estão presentes na interação de GPR6 e canabidiol.

Foi visto que a via de sinalização das beta arrestinas 2 é a via que está envolvida na formação de amiloide beta (THATHIAH et al., 2013). É possível que os resíduos vistos nas ligações entre GPR3 e GPR6 e canabidiol e que não são vistos na interação de GPR3 e AF64394, sejam específicos para a via das beta arestina 2, que é a via implicada na formação do amiloide beta.

Portanto, é possível que fármacos agonistas inversos de GPR3 que visassem esses resíduos poderiam ter um papel no tratamento da Doença de Alzheimer. São eles Gly 51, Val 54, Gly 90, Leu 93, Val 94, Thr 287, este último participando de ligação de hidrogênio com GPR6.

## 6. CONCLUSÃO

A categorização das interações proteína-ligante é de interesse, no desenvolvimento de fármacos. As interações moleculares importantes de um determinado conjunto de proteína e ligantes servem de guia para a busca de outras moléculas mais específicas para o seu alvo, mostrando menos efeitos adversos em alvos não desejados. No nosso trabalho procuramos elaborar, a partir dos achados de pesquisas recentes, que mostram o papel do receptor GPR3 na Doença de Alzheimer, e também categorizam seus recentemente descobertos agonistas inversos, e procurar os detalhes das interações intermoleculares desses agonistas inversos com GPR3, usando simulação computacional, e levando em conta os dados prévios obtidos experimentalmente. A falta de um modelo tridimensional de GPR3 obtido por cristalografia de raios X foi contornada usando um bom modelo feito a partir de uma proteína homóloga. Outra dificuldade foi a falta de dados em relação a esta proteína sobre o posicionamento espacial de seu bolsão de ligação. Obtivemos a localização desse bolsão usando dois métodos de simulações diferentes que se corroboraram, e estes dados são semelhantes à localização do bolsão na proteína homóloga (HANSON et al., 2012), além de dados semelhantes terem sido achados por outro grupo (MORALES et al., 2017). Observamos que as interações moleculares de GPR3 e canabidiol acontecem através de 14 interações hidrofóbicas. Na maioria dos complexos proteína-ligante, ligações hidrofóbicas e polares estão presentes. Forças aditivas acontecem no grande número de interações hidrofóbicas entre GPR3 e canabidiol, e as ligações de hidrogênio não são necessárias para interação de alta afinidade (SALENTIN et al., 2014). A nossa simulação computacional também pode corroborar os dados experimentais na interação molecular entre GPR3 e GPR6 e canabidiol, mostrando que a maior afinidade de ligação de canabidiol a GPR6 em relação a GPR3 se deve a uma ligação de hidrogênio com o resíduo Thr 319. (LAUN et al., 2017). Também podemos verificar os resíduos que são chave nas interações moleculares de GPR3 com os dois agonistas inversos, que são Ser50, Leu47, Phe97 e Leu 284. Também foi visto que a via das beta arrestinas 2 é a via de sinalização que está envolvida na formação de amiloide beta (THATHIAH et al., 2013). É possível que os resíduos vistos nas ligações entre GPR3 e GPR6 e canabidiol e que não são vistos na interação de GPR3 e AF64394, sejam específicos para a via das beta arestina 2. Portanto, fármacos agonistas inversos de GPR3 que visassem esses resíduos poderiam ter um papel no tratamento da Doença de Alzheimer. São eles Gly 51, Val 54, Gly 90, Leu 93, Val 94, Thr 287, este último participando de ligação de hidrogênio com GPR6. Esses achados poderão direcionar a pesquisa na obtenção de novos agonistas inversos de GPR3, que podem ter um papel importante no tratamento da Doença de Alzheimer.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, J.; TOTROV, M.; ABAGYAN, R. **Pocketome via Comprehensive Identification and Classification of Ligand Binding Envelopes**. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(6), 752–761. 2005.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. **Basic local alignment search tool**. *Journal of Molecular Biology*, 215(3):403-10. 1990.

ASO, E.; FERRER, I. **Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic**. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 37. 2014.

BERG, K.A.; CLARKE, W.P. **Making Sense of Pharmacology: Inverse Agonism and Functional Selectivity**. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 21(10), 962–977. 2018.

BERGAMASCHI, M.; QUEIROZ, R.; ZUARDI, A.; CRIPPA, J. **Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent**. *Current Drug Safety*, 6(4):237-49. 2017.

BERMAN, H.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.; BOURNE, P. **The protein data bank**. *Nucleic Acids Research*, 28, 235–242. 2000.

BEUMING, T.; SHERMAN, W. **Current assessment of docking into GPCR crystal structures and homology models: successes, challenges, and guidelines**. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(12):3263-77. 2012.

BLOCK, M.L.; ZECCA, L.; HONG, J.S. **Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms**. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1):57-69. 2007.

CAPALDI, S.; SUKU, E.; ANTONILI, M.; DI GIACOBBE, M.; GIORGETTI, A.; BUFELLI, M. **Allosteric sodium binding cavity in GPR3: a novel player in modulation of A $\beta$  production**. *Scientific Reports*, 8(1), 11102. 2018.

CAPRA, J. A.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M.; SINGH, M.; FUNKHOUSER, T. A. **Predicting protein ligand binding sites by combining evolutionary sequence conservation and 3D structure**. *PLoS Computational Biology*, 5(12), e1000585. 2009.

CASTELLANI, R.J.; Perry, G. **Pathogenesis and disease-modifying therapy in Alzheimer's disease: the flat line of progress.** Archives of Medical Research, 43(8):694-8. 2012.

CHEN, Y.; PENG, Y.; CHE, P.; GANNON, M.; LIU, Y.; LI, L.; BU, G.; VAN GROEN, T.; JIAO, K.; WANG, Q.  **$\alpha(2A)$  adrenergic receptor promotes amyloidogenesis through disrupting APP-SorLA interaction.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(48), 17296-301. 2014.

CLARK T. **G-Protein coupled receptors: answers from simulations.** Beilstein Journal of Organic Chemistry, 13, 1071-1078. 2017.

DE RUYCK, J.; BRYLSBAERT, G.; BLOSSEY, R.; LENSINK, M. **Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel.** Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry : AABC, 9, 1-11. 2016.

DEVINSKY, O.; CILIO, M.R.; CROSS, H.; FERNANDEZ-RUIZ, J.; FRENCH, J.; Hill C.; KATZ, R.; DI MARZO, V.; JUTRAS-ASWAD, D.; NOTCUTT, W.G.; MARTINEZ-ORGADO, J.; ROBSON, P.J.; ROHRBACK, B.G.; THIELE, E.; WHALLEY, B.; FRIEDMAN, D. **Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders.** Epilepsia, 55, 791–802. 2014.

DEVINSKY, O.; MARSH, E.; FRIEDMAN, D.; THIELE, E.; LAUX, L.; SULLIVAN, J.; MILLER, I.; FLAMINI, R.; WILFONG, A.; FILLOUX, F.; WONG, M.; TILTON, N.; BRUNO, P.; BLUVSTEIN, J.; HEDLUND, J.; KAMENS, R.; MACLEAN, J.; NANGIA, S.; SINGHAL, N.; WILSON, C.; PATEL, A.; CILIO, M. **Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial.** Lancet Neurology, 15(3):270-8. 2016.

DIXON, R.A.; KOBILKA, B.K.; STRADER, D.J.; BENOVIĆ, J.L.; DOHLMAN, H.G.; FRIELLE, T.; BOLANOWSKI, M.A.; BENNETT, C.D.; RANDS, E.; DIEHL, R.E.; MUMFORD, R.A.; SLATER, E.E.; SIGAL, I.S.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J.; STRADER, C.D. **Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin.** Nature, 321(6065):75-9; 1986.

DOZE, V.A.; PEREZ, D.M. **G-protein-coupled receptors in adult neurogenesis.** Pharmacological Reviews, 64(3):645-75. 2012.

EGGERICKX, D.; DENEFF, J.; LABBE, O.; HAYASHI, Y.; REFETOFF, S.; VASSART, G.; PARMENTIER, M.; LIBERT, F. **Molecular cloning of an orphan G-protein coupled receptor that constitutively activates adenylate cyclase.** The Biochemical Journal, 309, 837-43.1995.

EICHEL, K.; VON ZASTROW, M. **Subcellular Organization of GPCR Signaling.** Trends in Pharmacological Sciences, 39(2):200-208. 2018.

ERLANDSON, S.C.; MCMAHON, C.; KRUSE, A.C. **Structural Basis for G Protein–Coupled Receptor Signaling.** Annual Reviews in Biophysics, 47, 1-18. 2018.

ESPOSITO, G.; DE FILIPPIS, D.; MAIURI, M.C.; DE STEFANO, D.; CARNUCCIO, R.; IUVONE, T. **Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement.** Neuroscience Letters, 399(1-2):91-5. 2006.

ESPOSITO, G.; SCUDERI, C.; VALENZA, M.; TOGNA, G.I.; LATINA, V.; DE FILIPPIS, D.; CIPRIANO, M.; CARRATU, M.R.; IUVONE, T.; STEARDO, L. **Cannabidiol reduces A $\beta$ -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR $\gamma$  involvement.** PloS one, 6(12), e28668. 2011.

FREDRIKSSON, R.; LAGERSTROM, M.C.; LUNDIN, L.G.; SCHIOTH, H.B.öth HB. **The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.** Molecular Pharmacology, 63(6):1256-72. 2003.

FRIEDLAND, R. P.; Chapman, M. R. **The role of microbial amyloid in neurodegeneration.** PLoS Pathogens, 13(12), e1006654. 2017.

GAUTHIER, S.; ZHANG, H.; NG, K. P.; PASCOAL, T. A.; ROSA-NETO, P. **Impact of the biological definition of Alzheimer's disease using amyloid, tau and neurodegeneration (ATN): what about the role of vascular changes, inflammation, Lewy body pathology?.** Translational Neurodegeneration, 7, 12. 2018.

GHERSI, D.; SANCHEZ, R. **Structural bioinformatics EASYMIFS and SITEHOUND: a toolkit for the identification of ligand-binding sites in protein structures.** Bioinformatics, 25: 23, 3185–3186. 2009.

GUREVICH, V.V.; GUREVICH, E.V. **Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective.** International Journal of Molecular Sciences, 18(12): 2519. 2017.

HANSON, M.; ROTH, C.; JO, E.; GRIFFITH, M.; SCOTT, F.; REINHART, G.; DESALE, H.; CLEMONS, B.; CAHALAN, S.; SCHUERER, S.; SANNA, M.; HAN, G.; KUHN, P.; ROSEN, H.; STEVENS, R. **Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor.** Science (New York, N.Y.), 335(6070), 851-5. 2012.

HAUSER, A. S.; CHAVALI, S.; MASUHO, I.; JAHN, L. J.; MARTEMYANOV, K. A.; GLORIAM, D. E.; BABU, M. M. **Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets**. *Cell*, 172(1-2), 41-54.e19. 2018.

HEBERLE, G.; DE AZEVEDO, W.F. Jr. **Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations**. *Current Medicinal Chemistry*, 18(9):1339-52. 2011.

HEIBER, M.; DOCHERTY, J.M.; SHAH, G.; NGUYEN, T.; CHENG, R.; HENG, H.; MARCHESE, A.; TSUI, L.; SHI, X.; GEORGE, S. **Isolation of three novel human genes encoding G $\alpha$  protein coupled receptors**. *DNA Cell Biology*, 14(1):25-35. 1995.

HENEKA, M.T.; CARSON, M.J.; EL KHOURY, J.; LANDRETH, G.E.; BROSSERON, F.; FEINSTEIN, D.L.; JACOBS, A.H.; WYSS-CORAY, T.; VITORICA, J.; RANSOHOFF, R.M.; HERRUP, K.; FRAUTSCHY, S.A.; FINSEN, B.; BROWN, G.C.; VERKHRATSKY, A.; YAMANAKA, K.; KOISTINAHO, J.; LATZ, E.; HALLE, A.; PETZHOLD, G.C.; TOWN, T.; MORGAN, D.; SHINOHARA, M. L.; PERRY, V.H.; HOLMES, C.; BAZAN, N.G.; BROOKS, D. J.; HUNOT, S.; JOSEPH, B.; DEIGENDESCH, N.; GARASCHUK, O.; BODDEKE, E.; DINARELLO, C. A.; BREITNER, J. C.; COLE, G. M.; GOLENBOCK, D. T.; KUMMER, M. P. **Neuroinflammation in Alzheimer's disease**. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388-405. 2015.

HERNANDEZ, M.; GHERSI, D.; SANCHEZ, R. **SITEHOUND-web: a server for ligand binding site identification in protein structures**. *Nucleic Acids Research*, 37, Web Server issue W413–W416. 2009.

HUANG, Y.; SKWAREK-MARUSZEWSKA, A.; HORRE, K.; VANDEWYER, E.; WOLFS, L.; SNELLINX, A.; SAITO, T.; RADAELLI, E.; CORTHOUT, N.; COLOMBELLI, J.; LO, A.C.; VAN AERSCHOT, L.; CALLAERTS-VEGH, Z.; TRABZUNI, D.; BOSSERS, K.; VERHAAGEN, J.; RYTEN, M.; MUNCK, S.; D'HOOGE, R.; SWAAB, D.F.; HARDY, J.; SAIDO, T.C.; DE STROOPER, B.; THATHIAH, A. **Loss of GPR3 reduces the amyloid plaque burden and improves memory in Alzheimer's disease mouse models**. *Science Translational Medicine*, 7(309):309ra164. 2015.

HUANG, Y.; TODD, N.; THATHIAH, A. **The role of GPCRs in neurodegenerative diseases: avenues for therapeutic intervention**. *Current Opinion in Pharmacology*, 32():96-110. 2017.

HUSSEIN, H.; BORREL, A.; GENEIX, C.; PETITJEAN, M.; REGAD, L.; CAMPROUX, A. **PockDrug-Server: a new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins**. *Nucleic Acids Research*, 43(Web Server issue): W436–W442. 2015.

IRWIN, J.; SHOICHET, B. **ZINC-a free database of commercially available compounds for virtual screening.** Journal of Chemical Information and Modeling, 45(1), 177-82. 2005.

ISING, C.; HENEKA, M. T. **Functional and structural damage of neurons by innate immune mechanisms during neurodegeneration.** Cell death & Disease, 9(2), 120. 2018.

IUVONE, T.; ESPOSITO, G.; ESPOSITO, R.; SANTAMARIA, R.; DI ROSA, M.; IZZO, A. **Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from Cannabis sativa, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells.** Journal of Neurochemistry, 89(1):134-41. 2004.

JAZAYERI, A.; DIAS, J.; MARSHALL, F. **From G Protein-coupled Receptor Structure Resolution to Rational Drug Design.** The Journal of Biological Chemistry, 290(32), 19489-95. 2015.

JENSEN, T.; ELSTER, L.; NIELSEN, S.M.; PODA, S.B.; LOECHEL, F.; VOLBRACHT, C.; KLEWE, I.V.; DAVID, L.; WATSON, S.P. **The identification of GPR3 inverse agonist AF64394; the first small molecule inhibitor of GPR3 receptor function.** Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 15;24(22):5195-8. 2014.

KAHRAMAN, A.; MORRIS, R. J.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. **Shape Variation in Protein Binding Pockets and their Ligands.** Journal of Molecular Biology, 368(1), 283–301. 2007.

KATRITCH, V.; CHEREZOV, VHEREZOV, V.; STEVENS, R. **Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily.** Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 53, 531-56. 2012.

KOBILKA, B. K. **G Protein Coupled Receptor Structure and Activation.** Biochimica et Biophysica Acta, 1768(4), 794–807. 2007

KUFAREVA, I.; RUEDA, M.; KATRITCH, V.; STEVENS, R.; ABAGYAN, R. GPCR Dock 2010 participants. **Status of GPCR modeling and docking as reflected by community-wide GPCR Dock 2010 assessment.** Structure (London, England : 1993), 19(8), 1108-26. 2011.

KUUSISTO, J.; KOIVISTO, K.; MYKKANEN, L.; HELKALA, E.L.; VANHANEN, M.; HANNINEN, T.; KERVINEN, K.; KESANIEMI, Y.A.; RIEKKINEN, P.J.; LAAKSO, M. **Association between features of the insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease independently of apolipoprotein E4 phenotype: cross sectional population based study.** British Medical Journal, 315(7115):1045-9,1997.

- LASKOWSKI, R.; MACARTHUR, M.; MOSS, D.; THORNTON, J. **PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures.** Journal of Applied Crystallography, 26, 283-291. 1993.
- LASKOWSKI, R.; SWINDELLS, M. **LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery.** Journal of Chemical Information and Modeling, 51(10), 2778-2786. 2011.
- LAUN, A.S.; SONG, Z.H. **GPR3 and GPR6, novel molecular targets for cannabidiol.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 12;490(1):17-21. 2017.
- LAUN, A.S.; SCHRADER, S.H.; BROWN, K.J.; SONG, Z.H. **GPR3, GPR6, and GPR12 as novel molecular targets: their biological functions and interaction with cannabidiol.** Acta Pharmacologica Sinica, 40(3):300-308. 2018.
- LEELANANDA, S. LINDERT, S. **Computational methods in drug discovery.** Beilstein Journal of Organic Chemistry, 12, 2694-2718. 2016.
- LE GUILLOUX, V.; SCHMIDTKE, P.; TUFFERY, P. **Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection.** BMC Bioinformatics, 10, 168. 2009.
- MARCHESE, A.; DOCHERTY, J.M.; NGUYEN, T.; HEIBER, M.; CHENG, R.; HENG, H.H.; TSUI, L.C.; SHI, X.; GEORGE, S.R.; O'DOWD, B.F. **Cloning of human genes encoding novel G protein-coupled receptors.** Genomics, 23(3):609-18. 1994.
- MCGEER, P.L.; MCGEER, E.G. **The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy.** Acta Neuropathologica, 126(4):479-97. 2013.
- MESTRES, J.; GREGORI-PUIGJANE, E.; VALVERDE, S.; SOLE, R. **The topology of drug-target interaction networks: implicit dependence on drug properties and target families.** Molecular Biosystems, 5(9):1051-7. 2009.
- MOBAREC, J; FILIZOLA, M. **Advances in the Development and Application of Computational Methodologies for Structural Modeling of G-Protein Coupled Receptors.** Expert Opinion on Drug Discovery, 3(3), 343-355. 2008.
- MOREIRA, P.I.; ZHU, X.; WANG, X.; LEE, H.G.; NUNOMURA, A.; PETERSON, R.B.; PERRY, G.; SMITH, M.A. **Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration.** Biochimica and Biophysica Acta, 1802(1):212-20, 2010.
- MORALES, P.; HURST, D.; REGGIO, P. **Methods for the Development of In Silico GPCR Models.** Methods in Enzymology, 593, 405-448. 2017.

- MORALES, P.; ISAWI, I.; REGGIO, P.H. **Towards a better understanding of the cannabinoid-related orphan receptors GPR3, GPR6 and GPR12.** *Drug Metabolism Reviews*, 50(1), 74–93. 2018.
- MUNK, C.; ISBERG, V.; MORDALSKI, S.; HARPSOE, K.; RATAJ, K.; HAUSER, A.; KOLB, P.; BOJARSKI, A.; VRIEND, G.; GLORIAM, D. **GPCRdb: the G protein-coupled receptor database – an introduction.** *British Journal of Pharmacology*, 173(14): 2195–2207. 2016.
- NELSON, C. D.; SHENG, M. **Gpr3 stimulates A $\beta$  production via interactions with APP and  $\beta$ -arrestin2.** *PloS One*, 8(9), e74680. 2013.
- NGO, T.; KUFAREVA, I.; COLEMAN, J.; GRAHAM, R.; ABAGYAN, R.; SMITH, N. **Identifying ligands at orphan GPCRs: current status using structure-based approaches.** *British Journal of Pharmacology*, 173(20), 2934–2951. 2016.
- NITSCH, R.M.; DENG, M.; GROWDON, J.H.; WURTMAN, R.J. **Serotonin 5-HT<sub>2a</sub> and 5-HT<sub>2c</sub> receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion.** *Journal of Biological Chemistry*, 271(8):4188-94. 1996.
- OLIVELLA, M.; CALTABIANO, G.; CORDOMI, A. **The role of Cysteine 6.47 in class A GPCRs.** *BMC Structural Biology*, 13, 3. 2013.
- PAGE, R.M.; MUNCH, A.; HORN, T.; KUHN, P.H.; COLOMBO, A.; REINER, O.; BOUTROSS, M.; STEINER, H.; LICHTENTHALER, S.F.; HAASS, C.J. **Loss of PAFAH1B2 reduces amyloid- $\beta$  generation by promoting the degradation of amyloid precursor protein C-terminal fragments.** *Neuroscience*, 32(50):18204-14.9. 2012.
- PÉREZ, M. J.; JARA, C.; QUINTANILLA, R. A. **Contribution of Tau Pathology to Mitochondrial Impairment in Neurodegeneration.** *Frontiers in Neuroscience*, 12, 441. 2018.
- POOLER, A.M.; ARJONA, A.A.; LEE, R.K.; WURTMAN, R.J. **Prostaglandin E<sub>2</sub> regulates amyloid precursor protein expression via the EP<sub>2</sub> receptor in cultured rat microglia.** *Neuroscience Letters*, 362(2):127-30. 2004.
- PULKOSKI-GROSS, M.J.; GROSS, M.J.; DONALDSON, J.C.; OBEID, L. M. **Sphingosine-1-phosphate metabolism: A structural perspective.** *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 50(4), 298-313. 2015.
- RAMACHANDRAN, G.; SASISEKHARAN, V. **Conformation of polypeptides and proteins.** *Advances in Protein Chemistry*, 23:283-438.1968.
- REDDY, C.; VIJAYASARATHY, K.; SRINIVAS, E.; SASTRY, G.; SASTRY, G.N. **Homology modeling of membrane proteins: a critical assessment.** *Computational Biology and Chemistry*, 30(2):120-6. 2006.

RUIZ-MEDINA, J.; LEDENT, C.; VALVERDE, O. **GPR3 orphan receptor is involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury and regulates morphine-induced antinociception.** *Neuropharmacology*, 61, 43-50. 2011.

SALENTIN, S.; HAUPT, V. J.; DAMINELLI, S.; SCHROEDER, M. **Polypharmacology rescored: Protein–ligand interaction profiles for remote binding site similarity assessment.** *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 116(2-3), 174–186. 2014.

SARLUS, H.; HENEKA, M. T. **Microglia in Alzheimer's disease.** *The Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3240-3249. 2017.

SCAHILL, R.I.; SCHOTT, J.M.; STEVENS, J.M.; ROSSOR, M.N.; FOX, N.C. **Mapping the evolution of regional atrophy in Alzheimer's disease: unbiased analysis of fluid-registered serial MRI.** *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 99(7):4703-7. 2002.

SONG, Z.H.; MODI, W.; BONNER, T.I. **Molecular cloning and chromosomal localization of human genes encoding three closely related G protein-coupled receptors.** *Genomics*, 28(2):347-9. 1995.

STANLEY, N.; PARDO, L.; FABRITIIS, G. D. **The pathway of ligand entry from the membrane bilayer to a lipid G protein-coupled receptor.** *Scientific Reports*, 6, 22639. 2016.

STOCKERT, J.A.; DEVI, L.A. **Advancements in therapeutically targeting orphan GPCRs.** *Frontiers in Pharmacology*, 6():100. 2015.

SUN, S.; HU, F.; WU, J.; ZHANG, S. **Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons.** *Redox Biology*, 11:577–585. 2017.

SWANSON, A.; Wolf, T.; SITZMANN, A.; WILLETTE, A. A. **Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Pleiotropic roles for cytokines and neuronal pentraxins.** *Behavioural Brain Research*, 347, 49-56. 2018.

THATHIAH, A.; SPITTAELS, K.; HOFFMANN, M.; STAES, M.; COHEN, A.; HORRE, K.; VANBRABANT, M.; COUN, F.; BAEKELANDT, V.; DELACOURTE, A.; FISCHER, D.F.; POLLET, D.; DE STROOPER, B.; MERCHIERS, P. **The orphan G protein-coupled receptor 3 modulates amyloid-beta peptide generation in neurons.** *Science*, 323(5916):946-51. 2009.

THATHIAH, A.; HORRÉ, K.; SNELLINX, A.; VANDEWYER, E.; HUANG, Y.; CIESIELSKA, M.; DE KLOE, G.; MUNCK, S.; DE STROOPER, B.  **$\beta$ -arrestin 2 regulates A $\beta$  generation and  $\gamma$ -secretase activity in Alzheimer's disease.** *Nature Medicine*, 19(1):43-9. 2013.

- THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M.H. **MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking.** Journal of Medicinal Chemistry, 49(11):3315-21. 2006.
- TOPIWALA, H.; TERRERA, G. M.; STIRLAND, L.; SAUNDERSON, K.; RUSS, T. C.; DOZIER, M. F.; RITCHIE, C. W. (2018). **Lifestyle and neurodegeneration in midlife as expressed on functional magnetic resonance imaging: A systematic review.** Alzheimer's & Dementia, 4, 182-194, 2018.
- VALVERDE, O.; CELERIER, E.; BARANYI, M.; VANDERHAEGHEN, P.; MALDONADO, R.; SPERLAGH, B.; VASSART, G.; LEDENT, C. **GPR3 receptor, a novel actor in the emotional-like responses,** PLoS One, 4, e4704. 2009.
- WACKER, D.; STEVENS, R.C.; ROTH, B.L. **How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology.** Cell, 170(3):414-427. 2017.
- WALLACE, A.C.; LASKOWSKI, R.A.; THORNTON, J.M. **LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions.** Protein Engineering, 8(2):127-34. 1995.
- WANG, T.; MANDELKOW, E. **Tau in physiology and pathology.** Nature Reviews Neuroscience, 17(1):5-21. 2016.
- WANG, W.; QIAO, Y.; LI, Z. **New Insights into Modes of GPCR Activation.** Trends in Pharmacological Sciences, 39, (4): 367-386. 2018.
- WATT, G.; KARL, T. **In vivo Evidence for Therapeutic Properties of Cannabidiol (CBD) for Alzheimer's Disease.** Frontiers in Pharmacology, 8, 20. 2017.
- WEINTRAUB, S.; WICKLUND, A.H.; SALMON, D.P. **The neuropsychological profile of Alzheimer disease.** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2(4):a006171, 2012.
- WILKINS, H. M.; WEIDLING, I. W.; JI, Y.; SWERDLOW, R. H. **Mitochondria-Derived Damage-Associated Molecular Patterns in Neurodegeneration.** Frontiers in Immunology, 8, 508. 2017.
- WOOTTEN, D.; CHRISTOPOULOS, A.; MARTI-SOLANO, M.; BABU, M.M.; SEXTON, P.M. **Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors.** Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology, 19(10):638-653. 2018.
- WYSS-CORAY, T.; ROGERS, J. **Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature.** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2(1), a006346. 2012.

ZUCHELLA, C.; SINFORIANI, E.; TAMBURIN, S.; FEDERICO, A.; MANTOVANI, E.; BERNINI, S.; CASALE, R.; BARTOLO, M. **The Multidisciplinary Approach to Alzheimer's Disease and Dementia. A Narrative Review of Non-Pharmacological Treatment.** *Frontiers in Neurology*, 9, 1058. 2018.

## 8. ARTIGO APRESENTADO

### INTERMOLECULAR INTERACTIONS OF GPR3 AND ITS INVERSE AGONISTS CANNABIDIOL AND AF64394.

Silvana Russo\*, a,b,c, Walter Figueira de Azevedo Jr.,b,c, Andre Palmimi, a.

a Postgraduate Specialization Course in Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre-RS 90619-900, Brazil; b Laboratory of Computational Systems Biology, School of Sciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre-RS 90619-900, Brazil; c Postgraduate Specialization Course in Bioinformatics, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre-RS 90619-900, Brazil.

Corresponding Author – +55-51-99877767

Email address – [Silvana.Russo67@edu.pucrs.br](mailto:Silvana.Russo67@edu.pucrs.br) (S. Russo).

#### HIGHLIGHTS

- GPR3 is a membrane protein recently identified to be involved in Alzheimer's Disease;
- Cannabidiol is a safe drug, researched because of its neuroprotective properties, and recently approved to treat some forms of children's severe epilepsy, was also identified to be a ligand to GPR3;
- It is possible that cannabidiol have a role in the treatment of neurodegenerative diseases.

## **ABSTRACT**

Recent research links the orphan G Protein Coupled Receptor 3 (GPR3) to Alzheimer's Disease. Here we describe the molecular interactions between GPR3 and its newly identified inverse agonists, cannabidiol and AF64394. Alzheimer's Disease is considered a burden to the ageing population, presenting with cognitive decline, memory deficits, and contributing to death. Until now, there is no viable treatment, just ways to alleviate the symptoms. There is a need for novel molecular targets. Among them, the G Protein Coupled Receptors (GPCR) group has been widely studied by the pharmaceutical industry, with a significant number of drugs approved to treat human diseases. Recently, the orphan G Protein Coupled Receptor 3 (GPR3), from the GPCR family, for which no endogenous ligand has yet been found, has been researched in Alzheimer's Disease. It is expressed broadly in the Central Nervous System, and its relation to neurodegenerative disease has been brought to light in Alzheimer's Disease model research, where it was found to increase amyloid beta production. Some studies had now identified a few ligands to GPR3. The investigation of GPR3 molecular interactions with these ligands could help in the development of new drugs to treat neurodegenerative diseases. The main challenge in this investigation is the lack of available 3D structure for GPR3, which we intend to circumvent using computational simulations.

**Keywords:** GPR3, Alzheimer's Disease, neurodegeneration, cannabidiol.

## **Abbreviations**

GPR3, orphan G Protein Coupled Receptor 3; GPCR, G Protein Coupled Receptors; MVD, Molegro Virtual Docker; S1P1R, Sphingosine-1-Phosphate Receptor.

## Introduction

Alzheimer's Disease is a progressive neurodegenerative disorder associated with impairment of memory, cognitive deficits and behavioral abnormalities that has no treatment (1). It is a prevalent disease among elderly people, and, as this population grows, the number of people affected is expected to increase. Its main symptom is memory loss and dementia, causing a lot of disabilities in the affected patient and a burden to the supportive family (2). So far, there is no drug to treat this disease, only drugs to mitigate the symptoms. The most accepted hypothesis to Alzheimer's Disease postulates that the accumulation of amyloid beta in the neurons and its aggregation, is an initial event that later will lead to the formation of senile plaques, disrupting the normal tissue functioning (3). Therapies targeting the secretases, enzymes involved in amyloid beta formation, had disappointing results (4). So, the search for new molecular targets in Alzheimer's disease seems reasonable.

G Protein Coupled Receptors (GPCR) had been linked to Alzheimer's Disease(5,6). GPCR are the largest family of membrane proteins in the human genome (7). GPCR function is to transduce a wide variety of signals from the exterior of the cell, to its inside, starting a cascade of signaling events. The pharmaceutical market has developed a great number of drugs targeting them (8).

GPCR orphan proteins are poorly understood molecules (9). They lack a known endogenous ligand. Recently the orphan GPR3, a highly expressed receptor in the central nervous system, was linked with Alzheimer's Disease (10). Later work showed that knockout GPR3 mouse model had cognitive measurements improved in comparison to controls in the Alzheimer's disease mouse models (11). Also, it was seen a greater expression of GPR3 in human Alzheimer's brains comparing to controls (11). It was also discovered that GPR3 recruitment of beta arrestin 2 is necessary to the formation of amyloid beta (12). GPR3 is a protein who shows high levels of constitutive activity (13), so, it is believed that the

development of an inverse agonist of GPR3, biased towards beta arestin 2 signalling, if possible, would have a place in the treatment of Alzheimer's Disease (12).

Cannabidiol is one of the two major chemical constituents of the plant *Cannabis sativa*, the other one being Tetrahydrocannabinol, which is used for centuries for its recreational capabilities (14). Cannabidiol, on the other hand, is know by its lack of psychotomimetic properties and its antipsychotic effects in human and rodents (15). Recently, cannabidiol was approved by the Food and Drug Administration and considered effective and safe for treating children suffering from the severe forms of epilepsy, Dravet and Gaston-Leroux Syndromes (16), characterized by hundreds of convulsive attacks in just a day, and with limited improvement with anticonvulsivante drugs. Cannabidiol was shown to significantly lower the number of seizure attacks. Besides its recent use in children epilepsy, cannabidiol has been claimed to have antipsychotic and anxiolytic properties (17). Clinical trials are scarce. Experimental data shows promises in neurodegenerative processes. Data showed cannabidiol improved neurogenesis (18), diminished cellular death caused by amyloid beta and tau hyperphosphorilation (19). Cannabidiol also reversed cognitive decline in mouse models of Alzheimer's Disease (20), and it is investigated as a treatment option for this disease.

Using known lipid ligands to GPCRs, a group identified the inverse agonist function of cannabidiol in relation to GPR3 (21). It was showed that the effect was biased towards beta arrestin 2 pathway, the one involved in amyloid beta overproduction. It was taught that GPR3 inverse agonist drugs, with biased beta arresting 2 signalling effect would hava a paper in treating Alzheimer's Disease (21). In 2014 Jensen identified AF64394 as a GPR3 inverse agonist (22).

## Material and Methods

Our focus here is on the molecular interactions of GPR3 with its recently identified inverse agonists, cannabidiol and AF64394. Structural data for GPR3 is not available in the Protein Data Bank. The lack of this structure prompted us to look for a homologous model of GPR3, to carry out docking simulations. To achieve this, we first looked for the closest homolog of GPR3. We performed a Blast search (23), which returned Sphingosine-1-Phosphate Receptor (S1P1R), as the closest homolog to GPR3, showing 28% identity. S1P1R structure had been previously solved and deposited in the Protein Data Bank (24) under the access code 3V2Y. We then downloaded the structure 3V2Y of S1P1R complexed with its ligand ML056, and we used the program Molegro Virtual Docker(MVD) (25) to search and validate the best docking protocol for it. We ran several protocols in MVD until finding out the one which best reproduced the ligand location, the best protocol being MolDock Simplex Evolution as the search algorithm and Plants Score as the scoring function to calculate pose energy for all docking simulations. The Random Seed used was 1407176675. The Root Mean Square Deviation found was 0.77 Å (26).

We downloaded from G Protein Coupled Receptors Data Bank (27) a 3D model of GPR3 which was modeled after its homologous protein, S1P1R. We tested the quality of this model using the program Procheck (28) and a Rachmandran plot (29). Next, we use the program Sitehound (30) to locate the binding site of GPR3. The difficulty with this task is that, with no structure of GPR3 solved, the location of its binding site is not known.

We then used the coordinates of the center of the binding site found in GPR3 by Sitehound to feed MVD and proceed to perform the molecular docking of GPR3 and its ligands cannabidiol and AF64394, using the previous best protocol found using the 3V2Y structure, which was Plants Score as score function and MolDock Simplex Evolution as the search algorithm.

We downloaded the structures of the inverse agonist cannabidiol from the ZINC database (31), and we sketched the structure of AF64394 using the software Marvin JS from ChemAxon and the description of the molecule made by Jensen in his paper (22). We used the docking results as input in LigPlot (32), which returned us the main intermolecular interactions between GPR3 and cannabidiol and AF64394.

## **Results and Discussion**

### Quality of the Model

Ramachandran plot was generated and used to assess the quality of the GPR3 model. Analysis of the Ramachandran plot (28, 29)(figure not shown) showed that 88.9% of the residues were located in the most favorable regions, and 9.5% were located in the additional allowed regions. The overall rating of this model is better than the one for the template 3V2Y structure.

### Overall Description

Analysis of GPR3 structure shows the canonical GPCR structure (7,8) (Fig.1), with seven transmembrane helix, a short eighty helix packed intracellularly parallel to the membrane, one amine terminal, one carboxile terminal, three extracelular loops and three intracelular loops connecting the helical regions.

### Localization of the Binding Site of GPR3

We use Sitehound to locate the binding site of GPR3. The difficulty with this task is that, with no structure of GPR3 solved, the location of its binding site is not known. A specific aminoacid arrangement in the binding site controls ligand recognizing. The binding sites tend to have conserved residues, allowing its prediction. Sitehound (30) was able to retrieve a site

who resembles the one in S1P1R structure (Fig.2). On solving this structure, Stanley speculated that lipids entry site in GPCR would initiate from the membrane, close to the extracelulllar side, in a pocket formed by the helix 1, 2 and 7, which corresponds to the binding site location we found (33).

#### Docking Simulations

We used the coordinates of the center of the binding site found in GPR3 by Sitehound to feed MVD (25,26) and proceed to perform the molecular docking of GPR3 and its ligands cannabidiol and AF64394, using the previous best protocol found using the 3V2Y structure, which was Plants Score as score function and MolDock Simplex Evolution as the search algorithm. The center of the docking sphere found by Sitehound had the coordinates: X=0.21, Y=11 , and Z=-0.992.

#### Molecular Interactions of the inverse agonists and GPR3

We used the docking results from MVD as input in LigPlot, which returned us the main intermolecular interactions between GPR3 and canabidiol and AF64394. LigPlot (32) uses the structural information obtained from the program MVD to assign charges to the interactions of the pair of atoms from the complex protein-ligand. The specificity and affinity between a protein target and its related ligand depend on intermolecular hydrogen bonds, ionic interactions, and van der Waals contacts as well as on shape complementarity of the contact surfaces of both partners (34).

LigPlot showed the residues participating in the hidrophobic and hydrogen bonds interactions between GPR3 and ligands, showing the key residues that are responsible for the specificity of their interactions.

In the figure3 showing GPR3 and cannabidiol along with GPR6 and cannabidiol, the red circles evidientiate the equivalent residues in the two homolog proteins that participate in the

interaction with cannabidiol. The numbers are different but are considered equivalent, because they represent the residue position in the protein, and the two proteins have different lengths. There are 14 hydrophobic interactions between GPR3 and cannabidiol, and just 12 with GPR6. They have in common 8 residues interacting with cannabidiol. GPR6 and cannabidiol share a hydrogen bond in Thr 319, which is not present in GPR3-cannabidiol complex. This can explain the greatest affinity of GPR6 when compared to GPR3 in relation to cannabidiol (21). In the interaction with AF64394, GPR3 shows 9 hydrophobic interactions (fig 4).

The residues Ser50, Leu47, Phe97 and Leu 284, are important in the interactions of GPR3 to both inverse agonist ligands. On the other hand, the interactions with the residues Gly 51, Val 54, Gly 90, Leu 93, Val 94, and Thr 287, are seen only with GPR3 and its homolog protein GPR6 and cannabidiol, which is known to activate the beta arrestin 2 signalling cascade that is implicated in amyloid beta production in Alzheimer's Disease, after forming a complex with GPR3 (5).

The protein-ligand intermolecular interactions are essential to categorize the important residues involved in ligand recognition that can be used in drug development. The more specific interaction from a certain pair of ligand and target can become a guide in the search of new specific drugs which will show less adverse effects towards undesirable targets (35). Here we could see the important residues in the intermolecular interactions of GPR3. Besides that, by observing the residues specific to the interaction with cannabidiol, which is a beta arrestin 2 biased inverse agonist (5), in opposition to AF64394, which is biased towards G protein (22), we could have a clue of the residues to pay attention to when designing GPR3 inverse agonists biased to beta arrestin2, which is supposed to have an impact in amyloid beta production, and be a possibility in the treatment of Alzheimer's Disease.

## Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## References

- [1] A. Swanson, A.; T. Wolf, A. Sitzmann, A.A. willette, Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Pleiotropic roles for cytokines and neuronal pentraxins. *Behavioural Brain Research*, 347, 49-56. 2018.
- [2] C. Zucchella, E. Sinforiani, S.Tamburin, A. Federico, E. Mantovani, S. Bernini, R. Casale, M. Bartolo, The Multidisciplinary Approach to Alzheimer's Disease and Dementia. A Narrative Review of Non-Pharmacological Treatment. *Frontiers in Neurology*, 9, 1058. 2018.
- [3] T. Wang, E. Mandelkow, Tau in physiology and pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1):5-21. 2016.
- [4] R. Penninkilampi, H.M. Brothers, G.D. Eslick, Pharmacological Agents Targeting  $\gamma$ -Secretase Increase Risk of Cancer and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Alzheimers Disease*, 53(4):1395-404. 2016.
- [5] A. Thathiah, K. Horré, A.Snellinx, E, Vandewyer, Y. Huang, M. Ciesielska, G. De Kloe, S. Munck, B.De Strooper,  $\beta$ -arrestin 2 regulates  $A\beta$  generation and  $\gamma$ -secretase activity in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 19(1):43-9. 2012.
- [6] P.L. Mcgeer, E.G. Mcgeer, The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathologica*, 126(4):479-97. 2013.

- [7] B.K. Kobilka, G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(4), 794–807. 2007.
- [8] A.S. Hauser, S.Chavali, I. Masuho, I.J. Jahn, K.A. Martemyanov, D.E. Gloriam, M.M. Babu, Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. *Cell*, 172(1-2), 41-54.e19. 2018.
- [9] J.A. Stockert, L.A.Devi, Advancements in therapeutically targeting orphan GPCRs. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 100. 2015.
- [10] A. Thathiah, K. Spittaels, M. Hhoffmann, M. Staes, A. Cohen, K. Horre, M. Vanbrabant, F. Coun, V. Baekelandt, A. Delacourte, D.F. Fischer, D.Pollet, B. De Strooper, P. Merchiers, The orphan G protein-coupled receptor 3 modulates amyloid-beta peptide generation in neurons. *Science*, 323(5916):946-51. 2009.
- [11] Y. Huang, A. Skwarek-Maruszewska, K. Horre, E. Vandewyler, I. Wolfs, A. Snellinx, T. Saito, E. Radaelli, N. Corthout, J. Colombelli, A.C. Lo, I. Van Aerschot, Z. Callaerts-Vegh, D. Trabzuni, K. Bossers, J. Verhaagen, M. Ryten, S. Munck, R. D'Hooge, D.F. Swaab, J. Hardy, T.C. Saido, B. De Strooper, A. Thathiah, Loss of GPR3 reduces the amyloid plaque burden and improves memory in Alzheimer's disease mouse models. *Science Translational Medicine*, 7(309):309ra164. 2015.
- [12] C.D. Nelson, M. Sheng, Gpr3 stimulates A $\beta$  production via interactions with APP and  $\beta$ -arrestin2. *PloS One*, 8(9), e74680. 2013.
- [13] D. Eggerickx, J. Deneff, O. Labbe, Y. Hayashi, S. Refetoff, G. Vassart, M. Parmentier, F. Libert, Molecular cloning of an orphan G-protein coupled receptor that constitutively activates adenylate cyclase. *The Biochemical Journal*, 309, 837-43, 1995.
- [14] G. Watt, T. Karl, In vivo Evidence for Therapeutic Properties of Cannabidiol (CBD) for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 20. 2017.

- [15] C. Rohleder, J.K. Müller, B. Lange, F.M. Leweke, Cannabidiol as a Potential New Type of an Antipsychotic. A Critical Review of the Evidence. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 422. 2016.
- [16] O. Devinsky, E. Marsh, D. Friedman, E. Thiele, L. Laux, J. Sullivan, I. Miller, R. Flamini, A. Wilfong, F. Filloux, M. Wong, N. Tilton, P. Bruno, J. Bluvstein, J. Hedlund, R. Kamens, J. Maclean, S. Nangia, N. Singhal, C. Wilson, A. Patel, M.Cilio, Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *Lancet Neurology*, 15(3):270-8. 2016.
- [17] A.W. Zuardi, J.A. Crippa, J.E. Hallak, S. Bhattacharyya, Z. Atakan, R. Martin-Santos, P.K. McGuire, F.S. Guimarães, A critical review of the antipsychotic effects of cannabidiol: 30 years of a translational investigation. *Current Pharmaceutical Design*. 18(32):5131-40. 2012
- [18] S. Sun, F. Hu, F.; J. Wu, S. Zhang, Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons. *Redox Biology*, 11:577–585. 2017.
- [19] G. Esposito, C. Scuderi, M. Valenza, G.I. Togna, V. Latina, D. De Filippis, M. Cipriano, M. Carratu, T. Iuvone, I. Steardo, Cannabidiol reduces A $\beta$ -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR $\gamma$  involvement. *PloS One*, 6(12), e28668. 2011.
- [20] E. Aso, E., I. Ferrer, Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 37. 2014.
- [21] A.S. Laun, A.S.; Z.H. Song, GPR3 and GPR6, novel molecular targets for cannabidiol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(1):17-21. 2017.
- [22] T. Jensen, L. Elster, S.M. Nielsen, S.B. Poda, F. Loechel, C. Volbracht, I.V. Klewe, I. David, S.P. Watson, The identification of GPR3 inverse agonist AF64394; the first small molecule

inhibitor of GPR3 receptor function. *Bioorganic and Medicinal Chemical Letters*, 24(22):5195-8. 2014.

[23] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403-10. 1990.

[24] H. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. Bhat, H. Weissig, I. Shindyalov, P. Bourne, The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28, 235–242. 2000.

[25] R. Thomsen, M.H. Christensen, MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(11):3315-21. 2006.

[26] G. Heberle, G.; W.F. De Azevedo Jr, Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. *Current Medicinal Chemistry*, 18(9):1339-52. 2011.

[27] C. Munk, V. Isberg, S. Mordalski, K. Harpsoe, K. Rataj, A. Hauser, P. Kolb, A. Bojarski, G. Vriend, D. Gloriam, GPCRdb: the G protein-coupled receptor database – an introduction. *British Journal of Pharmacology*, 173(14): 2195–2207. 2016.

[28] R. Laskowski, M. Macarthur, M.; D. Moss, J. Thornton, PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26, 283-291. 1993.

[29] G. Ramachandran, V. Sasisekharan, Conformation of polypeptides and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 23:283-438. 1968.

[30] M. Hernandez, D. Ghersi, R. Sanchez, R. SITEHOUND-web: a server for ligand binding site identification in protein structures. *Nucleic Acids Research*, 37, Web Server issue W413–W416. 2009.

[31] J.J. Irwin, B.K. Shoichet, ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45(1), 177-182. 2005.

- [32] R. Laskowski, M. Swindells, LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(10), 2778–2786. 2011.
- [33] N. Stanley, L. Pardo, G.D. Fabritiis, The pathway of ligand entry from the membrane bilayer to a lipid G protein-coupled receptor. *Scientific Reports*, 6, 22639. 2016.
- [34] S. Russo, W.F. De Azevedo, Advances in the Understanding of the Cannabinoid Receptor 1 - Focusing on the Inverse Agonists Interactions. *Current Medicinal Chemistry*. 25, 1-12. 2018.
- [35] S. Salentin, V.J. Haupt, S. Daminelli, M. Schroeder, Polypharmacology rescored: Protein–ligand interaction profiles for remote binding site similarity assessment. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 116(2-3), 174–186. 2014.

### **Figure Legends-**

Fig. 1- GPR3 structure complexed with cannabidiol. There are the canonical 8 transmembrane helix, 3 intracellular loops, 3 extracellular loops present in the all members of GPCR group.

Fig. 2- Ligand Binding Site of GPR3, found by the program Sitehound, showing its coordinates and the importante residues.

Fig. 3- Intermolecular interactions between GPR3 and cannabidiol to the left and GPR6 and cannabidiol to the right.

Fig. 4- Intermolecular interactions between GPR3 and cannabidiol to the left and GPR3 and AF64394 to the right.

## Figures

Figure 1

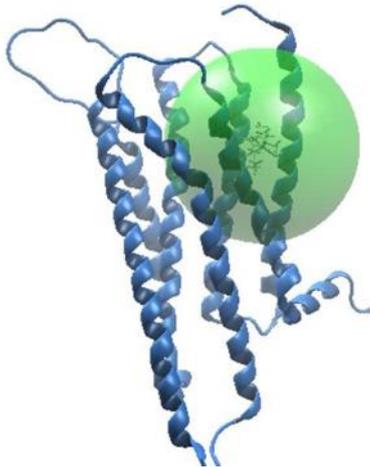


Figure 2

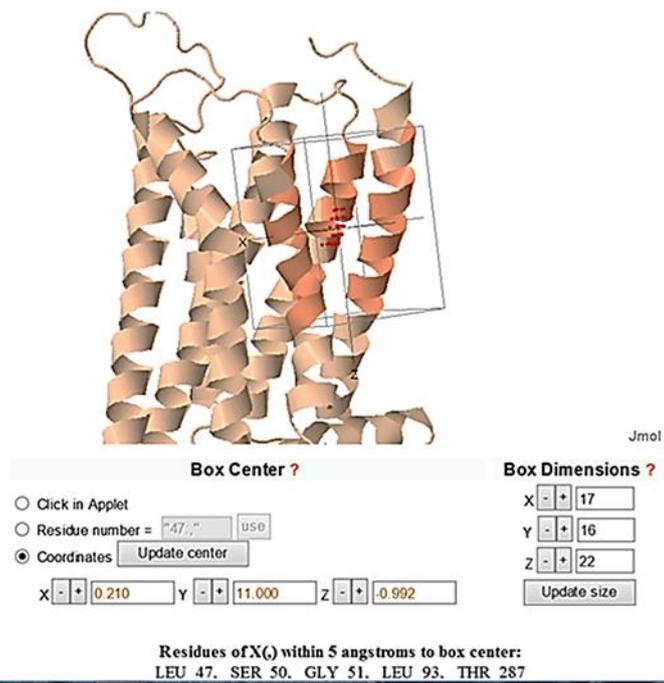


Figure 3

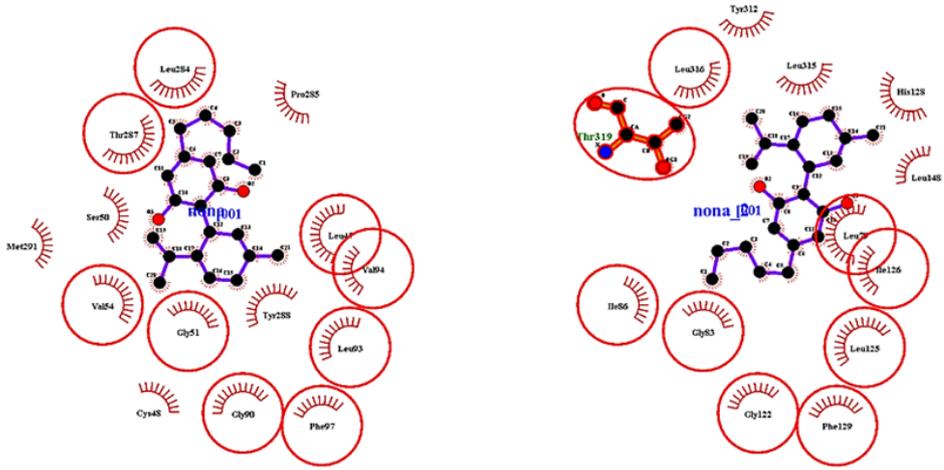
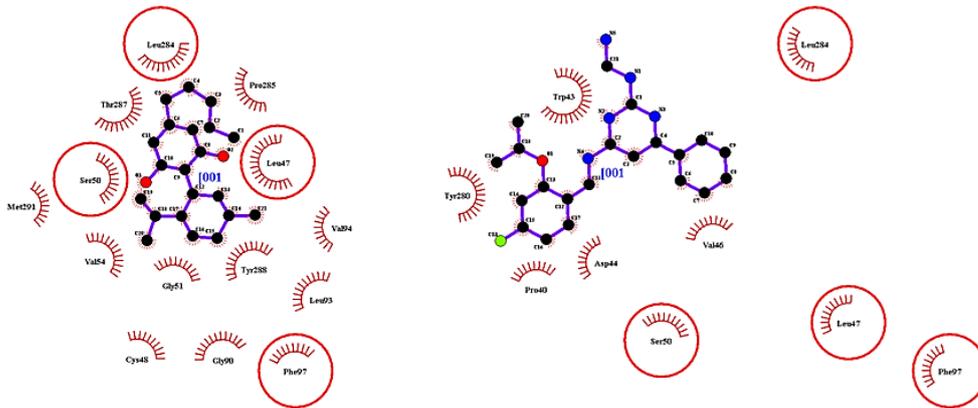


Figure 4



Biochemical and Biophysical Research Communications: Submission Confirmation  
BBRC (ELS) <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Hoje, 17:35 Silvana Da Cunha

Russo;silvanacrusso@hotmail.com;walter.junior@puers.br;andre.palmini@puers.br

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Title: INTERMOLECULAR INTERACTIONS OF GPR3 AND ITS INVERSE AGONISTS  
CANNABIDIOL AND AF64394.

Corresponding Author: Dr. Silvana Russo

Authors: Walter Azevedo; Andre Palmini

Short communication/Full length article

Dear Dr. Russo,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Biochemical and Biophysical Research Communications. If you have the same submission kept incomplete in your profile or your co-author's profile, please remove it.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Biochemical and Biophysical Research Communications as an author:

<https://ees.elsevier.com/bbrc/>

Your username is: Silvana.Russo67@edu.puers.br

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/\[YBBRC\]/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/[YBBRC]/automail_query.asp)

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Biochemical and Biophysical Research Communications. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Email: bbrc@elsevier.com



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)