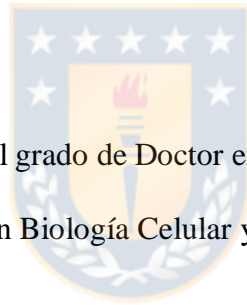


Universidad de Concepción

Escuela de Graduados

**The Importance of Glycine Receptor Clustering in the Functional
Maturation of Spinal Synapses**

Brigitte van Zundert



Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
mención Biología Celular y Molecular

Tutor: Dr. Luis Aguayo

Laboratorio de Neurofisiología, Departamento de Fisiología
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción

Concepción – Chile

2002

RESUMEN

Considerando abundantes estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos se ha generado un modelo que describe la estructura de la sinápsis glicinérgica en neuronas espinales. Así, se postula que el citoesqueleto, a través la proteína periférica geferina, ancla el receptor de glicina (R-Gli) a sitios específicos de la membrana post-sináptica. Al mismo tiempo que el R-Gli forma estas agrupaciones, la transmisión sináptica inhibitoria espontánea (mIPSC) aumenta. Además, varias de las propiedades fisiológicas de la corriente activada por glicina (I_{glicina}) son modificadas, incluyendo su sensibilidad a glicina y su regulación por proteína G. A través de la técnica 'whole-cell patch-clamp' y mediante análisis de microscopía confocal, hemos estudiado sí el agrupamiento de los R-Gli en la membrana postsináptica por geferina y el citoesqueleto regula los cambios fisiológicos del receptor durante el desarrollo de la médula espinal.

Uno de los principales resultados de este tesis es que los microtúbulos regulan la función y estructura de las agrupaciones sinápticas del R-Gli en una forma dependiente del estado del desarrollo. Así, se encontró que la aplicación aguda de colchicina disminuía significativamente la amplitud de mIPSC glicinérgicas (30%) en neuronas inmaduras (5-7 DIV), mientras que no tenía efectos sobre neuronas maduras (15-17 DIV). Análisis cinéticos y el bloqueo de mIPSC glicinérgicas con picrotoxina, reveló la presencia de la forma $\alpha_2\beta$ neonatal (eventos lentos) y $\alpha_1\beta$ adulta (eventos rápidos) del R-Gli. La depolimerización de microtúbulos afectó preferencialmente a receptores $\alpha_2\beta$ sinápticos. Luego de la maduración

sináptica se encontró que principalmente la forma adulta del R-Gli permanecía en la membrana postsináptica y que el tratamiento con colchicina no fue efectivo en este estado.

En forma similar a lo observado para microtúbulos, encontramos que citocalasina-D producía alteraciones en las propiedades fisiológicas de la transmisión glicinérgica, que dependía del grado de maduración de las neuronas espinales, modificando los R-Gli postsinápticos sólo en células inmaduras. La aplicación intracélular de citocalasina-D y latrunculina-A en neuronas inmaduras, aumentó significativamente (190%) la frecuencia de las mIPSC glicinérgicas, sin variar la amplitud de los eventos. Aunque ambas drogas son membrana permeable, la aplicación extracélular de citocalasina-D y latrunculina-A resultó en una importante reducción de la transmisión sináptica total y glicinérgica. Estos resultados indican que los filamentos pre y postsinápticos están involucrados en el mantenimiento de la transmisión glicinérgica en neuronas espinales inmaduras

Con el objetivo de bloquear la formación de agrupaciones de R-Gli sin alterar el citoesqueleto, cultivos de neuronas espinales fueron tratados con un oligonucleótido antisentido para geferina. Este tratamiento resultó en la pérdida de las agrupaciones de R-Gli sinápticas lo cual se correlacionó con una reducción casi completa en la transmisión glicinérgica. Sin embargo, el tratamiento tanto con el oligonucleótido antisentido, como con las drogas depolimerizantes del citoesqueleto (utilizados en forma aguda y crónica), fueron incapaces de alterar el "rundown" de las corrientes evocadas por glicina o la sensibilidad de la I_{glicina} a glicina, estriknina o picrotoxina. Al cuantificar el conjunto de los resultados obtenidos, nos permite estimar que gran parte (~65%) de la I_{glicina} se debe a la activación de los receptores extrasinápticos y por lo tanto concluimos que la farmacología y la estabilidad funcional de los R-Gli extrasinápticos no dependen de una interacción con geferina y el citoesqueleto.

Finalmente, analizamos si existía un “cross-talk” entre el R-Gli y proteínas G en la membrana postsináptica. Fue así como encontramos que en células tratadas con el oligonucleótido antisentido para geferina, la aplicación de GTP- γ -S a través de la pipeta de patch no fue capaz de potenciar a I_{glicina} . Por otro lado, estudios de transmisión glicinérgica revelaron que GTP- γ -S producía un aumento de dos veces en la constante de decaimiento de los eventos rápidos ($\alpha_1\beta$), pero no de los eventos lentos ($\alpha_2\beta$). En conjunto, estos resultados sugieren que existiría un cross-talk entre un receptor asociados a proteínas G (GPCR) y el R-Gli $\alpha_1\beta$ postsináptico, interacción que se ve favorecida durante desarrollo.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis indican que dependiendo del estado de maduración de las neuronas y de la expresión de las diferentes subunidades de R-Gli, la organización de los microtúbulos y microfilamentos regula la transmisión glicinérgica en neuronas de médula espinal. Además, nuestros estudios nos permiten postular que la interacción del R-Gli con geferina y el citoesqueleto no sólo facilita el anclaje de los receptores frente a los terminales presinápticos, sino que también posibilita la formación de microdominios con otras moléculas involucradas en la transducción de señales, incluyendo receptores metabotrópicos.