



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas,
área Biología Celular y Molecular

**Presencia de aminoácidos básicos en el dominio
citoplasmático de los receptores de glicina y GABA_A son
críticos para la modulación por G $\beta\gamma$ y etanol**

PATRICIO ALEJANDRO CASTRO MALDONADO
CONCEPCIÓN-CHILE
2012

Profesor Guía: Luis G Aguayo Hernández
Dpto. de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

RESUMEN

El etanol es una de las drogas de abuso mas ampliamente utilizadas a nivel mundial generando cuantiosas pérdidas de dinero así como de vidas humanas debido a su consumo. ¿Cómo el etanol, a concentraciones fisiológicamente relevantes (< 100 mM), es capaz de producir sus efectos tanto a nivel sistémico como a nivel celular? y ¿cuáles son los determinantes para que estos efectos se produzcan? son aún desconocidos.

Se ha descrito que esta droga modula a los receptores de glicina (R-Gli), GABA_A (R-GABA_A), GABA_C (R-GABA_C), serotonina tipo 3 (5-HT₃) y nicotínicos de acetilcolina (R-nACh), los cuales pertenecen a la superfamilia de los canales iónicos activados por ligando (Cys-loop LGICs). Estudios realizados en animales han demostrado una importante participación de los receptores de R-Gli y R-GABA_A en algunos efectos sistémicos como la inducción de sueño, lo que da relevancia a su estudio, así como su participación en importantes funciones fisiológicas que van desde el control motor hasta la generación de complejas funciones cognitivas.

Proteínas intracelulares también han sido vinculadas a los efectos del etanol, dentro de las cuales encontramos a las adenilil ciclasas (AC), la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC), la fosfolipasa C (PLC) y recientemente a proteínas G.

Estos dos blancos para la acción del etanol (receptores y proteínas intracelulares) han sustentado la generación de dos hipótesis que han tratado de explicar los efectos de esta droga a nivel celular. La primera de ellas se refiere a la acción directa del etanol en los receptores tipo canales iónicos, mientras que la

segunda hipótesis contempla una modulación indirecta de estos receptores a través de proteínas efectoras intracelulares, las cuales serían en primera instancia el blanco del etanol.

La modulación del R-Gli por etanol ha sido ampliamente descrita y aceptada, a diferencia del R-GABA_A, donde los numerosos estudios realizados no han logrado establecer un mecanismo de acción común. En el R-Gli se han identificado residuos claves de carácter básico (316-320, 385-386) presentes en el ICD, los cuales serían cruciales para que esta modulación se lleve a cabo. A su vez, la activación de Gβγ es crítica para la sensibilidad al etanol en este receptor. En el R-GABA_A existen sub-unidades que poseen agrupaciones de aminoácidos básicos homólogos a los encontrados en la sub-unidad α₁ del R-Gli en su dominio intracelular, lo cual permite postular un mecanismo similar de modulación al encontrado en el R-Gli.

Por lo anterior es que nos propusimos estudiar **si residuos básicos presentes en los dominios intracelulares de los R-Gli y R-GABA_A participan en la interacción y modulación efectuada por Gβγ y etanol.**

Para evaluar esta hipótesis realizamos experimentos de sobreexpresión de la subunidad α₁ del R-Gli WT y mutantes del residuo ³⁸⁵K con aminoácidos con diferentes propiedades fisicoquímicas, encontrando que solo aminoácidos básicos (K y R) mantienen la sensibilidad a etanol no alterándose la sensibilidad a otros moduladores como neuroesteroides o anestésicos generales como α-xalona y propofol respectivamente, donde todas las mutantes se expresan y comportan farmacológicamente similares al receptor WT.

Para el caso del R-GABA_A, evaluamos la asociación de algunas de sus subunidades con Gβγ, encontrando un patrón gradual de unión, donde la subunidad α₁ une Gβγ en forma similar a α₁ del R-Gli; las subunidades γ₂ y α₆ lo hacen en menor grado, mientras que α₄ no presenta unión. Posteriormente, decidimos construir una proteína quimérica entre las subunidades α₁ del R-Gli y la subunidad γ₂ del R-GABA_A, lo cual identificó a 2 regiones importantes para la modulación por etanol en este receptor. Una de ellas comprende al dominio TM₄, que tendría implicancia en el gating del canal, mientras la segunda ubicada en el dominio N-terminal del IL entre los residuos 309 y 313 sería importante para preservar una estructura α-hélice de la región. Finalmente, la posición homóloga a ³⁸⁵K en el R-Gli (408 en el receptor quimérico) es fundamental para reestablecer el efecto de etanol en el receptor α₁-γ₂. Todos estos hallazgos demuestran que la presencia de: i) un gating energéticamente favorable, ii) una estructura α-hélice en la región N-terminal de IL y iii) un residuo básico en la posición homóloga 385 del R-Gli son fundamentales para conferir sensibilidad a etanol en este receptor.

En conclusión, podemos decir que el carácter básico del residuo 385 es crucial para la sensibilidad a etanol en α₁ R-Gli, mientras el R-GABA_A posee subunidades capaces de interactuar con Gβγ en forma similar a α₁ R-Gli, lo cual podría revelar un mecanismo de modulación similar para ambos receptores.