

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



**“Identificación de residuos localizados en el dominio  
citoplasmático entre las regiones TM3 y TM4 críticos para la  
modulación alostérica de receptores de glicina y GABA<sub>A</sub> por  
propofol y etanol”**

Tesis de Doctorado presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de  
Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en  
Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular

Por

**Gustavo Alonso Moraga Cid**

2009

## RESUMEN

A pesar de los extensos estudios realizados a lo largo de casi un siglo, los mecanismos involucrados en los efectos ejercidos por etanol y anestésicos generales sobre la función del SNC permanecen poco entendidos. En contraste a lo que ocurre con otras clases de drogas, los efectos de etanol y anestésicos generales fueron por largo tiempo atribuidos a la acción en múltiples sitios inespecíficos localizados a nivel de la membrana plasmática. Sin embargo, a partir de la década de 1980 comenzó a cobrar vigor la hipótesis que propone a proteínas como blancos específicos de estos fármacos. En este contexto, los receptores para los neurotransmisores glicina (RGli) y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (RGABA<sub>A</sub>) han surgido como los blancos moleculares más importantes para los efectos ejercidos por etanol y anestésicos generales. La hipótesis actualmente aceptada para explicar los mecanismos moleculares por los cuales ocurren estos fenómenos de modulación, propone la existencia de potenciales sitios de interacción usados tanto por etanol como por anestésicos generales. Los residuos que componen estos potenciales sitios se encuentran localizados en las regiones transmembrana (TMs) del receptor, ubicación que les permite formar bolsillos o cavidades capaces de reconocer, con muy baja selectividad, una serie de moduladores estructuralmente divergentes.

Por otra parte, evidencia reciente ha permitido generar una hipótesis alternativa. Ésta propone que la modulación del RGli está intrínsecamente ligada al grado de activación de las proteínas G. Estudios realizados en nuestro laboratorio permitieron sugerir que ésta modulación es producto de la interacción del heterodímero G $\beta\gamma$  con un grupo de residuos (<sup>316</sup>RFRRK<sup>320</sup> y <sup>385</sup>KK<sup>386</sup>) localizados en el dominio citoplasmático entre el TM3 y TM4 del RGli. Basados en estas observaciones, surgen una serie de interrogantes que necesitan ser respondidas,

como por ejemplo, ¿Son estos sitios compartidos por otros moduladores alostéricos del RGLi? o ¿Posee también este dominio intracelular residuos aminoacídicos determinantes para la sensibilidad del RGLi a otros moduladores? ¿Existen residuos homólogos en la región citoplasmática de otros miembros de la superfamilia LGICs que cumplan un rol similar?

De esta forma, el trabajo realizado en ésta tesis generó información que permitió contestar algunas de estas importantes interrogantes. Primero, abordamos el grado de selectividad de estos nuevos sitios descritos como críticos para etanol en términos de la sensibilidad a otros moduladores del RGLi. Nuestros datos muestran que la mutación de estos residuos redujo significativamente la sensibilidad del RGLi a etanol, sin alterar la capacidad del receptor de ser modulado por otros fármacos alostéricos, como *n*-alcoholes o anestésicos generales. Además, estudiamos el fenómeno de “cutoff” en una serie homóloga de *n*-alcoholes, el cual indirectamente podría dar cuenta de la presencia de una cavidad o bolsillo con un volumen determinado. En particular y a diferencia de lo reportado para los sitios transmembrana, estos residuos (<sup>316</sup>RFRRK<sup>320</sup> y <sup>385</sup>KK<sup>386</sup>) no formarían un bolsillo de unión, con un volumen aceptor determinado, debido a que el fenómeno de cutoff no sufrió modificaciones en los RGLi hiposensibles a etanol. **Estos observaciones muestran por primera vez que residuos importantes para la acción de etanol en el RGLi, no son relevantes para la sensibilidad del receptor a otros moduladores alostéricos, lo que nos permite sugerir que este nuevo mecanismo de acción descrito para etanol, es de una naturaleza molecular diferente a los mecanismos utilizados por otros moduladores del RGLi.**

Con estos datos en mente, es claro que existen residuos localizados en el dominio intracelular importantes para los efectos de etanol sobre el RGLi, pero ¿es

esta región importante para la acción de otros moduladores como anestésicos generales? **Nuestros datos funcionales nos permiten sugerir un nuevo sitio para la acción del anestésico general intravenoso propofol, distinto a los descritos previamente, y más aún nos permiten sugerir por primera vez que la potenciación de las corrientes de glicina y GABA por propofol ocurre principalmente por una vía intracelular.** Estas conclusiones se encuentran sostenidas por los datos obtenidos a través de tres estrategias experimentales independientes. Primero, utilizando estudios de mutagénesis sitio dirigida, realizados en los dominios citoplasmáticos de las subunidades  $\alpha_1$  del RGLi y  $\alpha_1$  y  $\beta_2$  del RGABA<sub>A</sub>, determinamos que un residuo de Fenilalanina, localizado en regiones homólogas de la subunidades  $\alpha_1$  del RGLi (F380) y  $\alpha_1$  del RGABA<sub>A</sub> (F385) es el responsable de la sensibilidad a propofol, mientras que la subunidad  $\beta_2$  del RGABA<sub>A</sub> no juega un rol crítico en la sensibilidad de este receptor a propofol. Estos sitios demostraron ser altamente selectivos para propofol, no resultando relevantes para la potenciación del receptor por otros moduladores alostéricos. Segundo, utilizando diálisis intracelular de proteínas con demostrada capacidad de unir propofol, determinamos que propofol debe alcanzar el espacio intracelular como un paso previo a la modulación de los RGLi y RGABA<sub>A</sub>, tanto en sistemas recombinantes de expresión como en neuronas en cultivo. Tercero, utilizando análisis de registros de canal único determinamos que la sustitución de los residuos F380 en el RGLi y F385 en el RGABA<sub>A</sub> redujo significativamente la potenciación de la probabilidad de apertura del canal, sin alterar sus parámetros cinéticos como el tiempo de apertura promedio y su conductancia.

**En conclusión, los datos generados en esta tesis nos permiten extender nuestro conocimiento acerca de los mecanismos involucrados en la**

**modulación alostérica de los miembros de la superfamilia LGICs. Nuestros resultados nos permiten sugerir que el dominio citoplasmático mayor de los miembros de la familia LGICs, presenta residuos específicos y distintos para la acción de etanol y propofol. Estos resultados permiten además, iniciar nuevos estudios en la generación de drogas con minimos efectos indeseados.**

