

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
ESCUELA DE GRADUADOS

**Regulación de receptores de glicina por sistemas de
transducción de señales acoplados a proteínas G. Papel de las
proteínas G en la potenciación del receptor de glicina por etanol**



Gonzalo Enrique Yévenes Crisóstomo

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

Tutor: Dr. Luis G. Aguayo H.

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

Concepción – Chile

2007

RESUMEN

El receptor de glicina es un miembro de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando y posee un rol importante en la regulación de la excitabilidad neuronal en la medula espinal y bulbo raquídeo de mamíferos. La función del R-Gli puede ser modulada por ligandos exógenos de diferentes naturalezas químicas, como por ejemplo, el alcaloide estricnina, iones zinc, anestésicos generales y etanol. Por otra parte, la actividad del receptor también puede ser regulada intracelularmente, a través de proteínas quinasas y mediante modulación directa por el heterodímero $G\beta\gamma$. En este contexto, es de una particular importancia para nuestro laboratorio caracterizar los determinantes moleculares involucrados en la modulación mediada por $G\beta\gamma$ presentes en el segmento citosólico, lo que permitirá además examinar el rol de las proteínas G en la sensibilidad del receptor a etanol. El presente trabajo utilizó como estrategia principal la expresión de subunidades α R-Gli silvestres, quiméricas y mutadas en células HEK 293, para posteriormente analizar la modulación mediada por $G\beta\gamma$ y etanol mediante electrofisiología.

Estudios funcionales de α_1 R-Gli deletados y mutados en la región intracelular permitieron determinar que dos secuencias de carácter básico (³¹⁶RFRRK y ³⁸⁵KK) posicionadas en ambos extremos del segmento intracelular son claves para la modulación de la subunidad α_1 del R-Gli humano por $G\beta\gamma$. Por otro lado, estudiando las propiedades fisiológicas de estos R-Gli se pudo deducir que la región intracelular entre el TM3 y el TM4 es también importante en la determinación de algunas propiedades funcionales del receptor, como por ejemplo, sensibilidad a glicina y desensibilización. En

particular, el reemplazo por alaninas de la secuencia ³¹⁶RFRRK afectó profundamente la sensibilidad del receptor a glicina y su desensibilización independientemente del sitio extracelular de unión a ligando, lo que sugiere un rol importante de esta secuencia para la correcta función del canal iónico en eventos posteriores de la unión del agonista. Al estudiar la regulación de R-Gli silvestres y quiméricos de la subunidad α_1 y α_2 por $G\beta\gamma$ se pudo determinar que la modulación funcional positiva de $G\beta\gamma$ en α_1 R-Gli no dependería exclusivamente de la unión del heterodímero al receptor, ya que la sustitución de los únicos dos residuos no conservados (G254 y S296) entre las regiones de transmembrana de la subunidad α_1 y α_2 alteró significativamente la modulación funcional positiva de $G\beta\gamma$ sin alterar los sitios intracelulares de aminoácidos básicos. De este modo, los resultados obtenidos y otros datos generados dentro de nuestro laboratorio permitieron proponer un modelo para la regulación funcional del α_1 R-Gli por $G\beta\gamma$, el cual se compone de una primera etapa de unión del heterodímero a la región intracelular de α_1 R-Gli a través de las secuencias de residuos básicos, y de una segunda etapa de cambios conformacionales de los dominios de transmembrana del receptor provocados por la unión de $G\beta\gamma$, lo que finalmente produce una conformación del canal iónico con una mayor probabilidad de apertura en presencia de glicina.

Utilizando estrategias similares, se examinó el rol de la región intracelular del R-Gli y de la regulación mediada por $G\beta\gamma$ en los efectos de etanol. Los resultados de esta tesis demostraron que la potenciación de la corriente activada por glicina producida por concentraciones farmacológicas de etanol sería un fenómeno mayoritariamente indirecto, dependiente de la señalización intracelular mediada por el heterodímero $G\beta\gamma$. Esta conclusión se

encuentra principalmente sostenida en base a la caracterización de los R-Gli mutados, los cuales mostraron que el efecto de etanol fue atenuado específicamente por mutaciones intracelulares asociadas a la regulación por $G\beta\gamma$ de α_1 R-Gli, con una correlación positiva entre la sensibilidad a etanol de cada mutante y su grado de modulación por $G\beta\gamma$. Coincidentemente, la potenciación inducida por etanol en α_1 R-Gli silvestres fue atenuada específicamente mediante la sobreexpresión de proteínas que unen $G\beta\gamma$ con alta afinidad, lo que indica un requerimiento de subunidades $G\beta\gamma$ libres para el efecto de etanol en el receptor.

En conjunto, las evidencias presentadas en este trabajo de tesis describen por primera vez regiones en el R-Gli que son reguladas por $G\beta\gamma$, lo que contribuye al conocimiento del rol de los segmentos intracelulares para la correcta estructura, localización, función y regulación de todos los miembros de la superfamilia LGIC. Además, se describen por primera vez la existencia de sitios intracelulares específicos para los efectos de etanol en el R-Gli y también se demuestra un rol clave de la señalización mediada por $G\beta\gamma$ en el mecanismo de acción de etanol.

En conclusión, los resultados de este estudio permiten proponer una hipótesis nueva acerca de la regulación de la superfamilia LGIC por etanol, y además, enriquecen el conocimiento acerca de los mecanismos mediante los cuales el alcohol afecta el sistema nervioso humano.