



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM, CAMPUS JURIQUILLA

**CARACTERIZACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN A β -CARBOLINAS EN EL RECEPTOR
GABA_A EN OLIGODENDROCITO DE RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. Osvaldo Hinojosa Ortiz

TUTORES:

DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DRA. TERESA EDITH GARAY ROJAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. AUREA OROZCO RIVAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Querétaro, Septiembre de 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Miembros del jurado

Dr. Daniel Reyes Haro	Presidente
Dr. Rogelio Arellano Ostoia	Secretario
Dra. Laura Cristina Berumen Segura	Vocal
Dra. Mónica López Hidalgo	Suplente
Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez	Suplente

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología
Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la
Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría
del Dr. Rogelio Arellano Ostoia y la Dra. Teresa Edith Garay
Rojas. Becario CONACyT No. 613285.**

Resumen

La mielinización de los axones neuronales en el sistema nervioso central son responsabilidad de los oligodendrocitos. Los factores que promueven este proceso de mielinización dependen de la comunicación entre neuronas y oligodendrocitos. Existen, sin embargo, condiciones patológicas que disminuyen o eliminan la vaina de mielina, por lo que el estudio de este proceso tiene importantes implicaciones clínicas. Entre las moléculas señalizadoras oligodendrocito-neurona se ha identificado al ácido γ -aminobutírico (GABA), el cual es reconocido por el oligodendrocito por receptores ionotrópicos (llamados GABA_A) y metabotrópicos (llamados GABA_B). Este trabajo se enfocó en el receptor ionotrópico conformado por las subunidades $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ que en trabajos anteriores se ha propuesto como el receptor de mayor abundancia en oligodendrocitos provenientes del nervio óptico de rata. Una particularidad de éste es su modulación positiva por una β -carbolina endógena llamada β -CCB, pues tiene un efecto contrario al observado en neuronas, donde funciona como un agonista inverso de la actividad de GABA. Su acción como modulador negativo neuronal se ha relacionado con el sitio clásico de unión a benzodiazepinas (BDZ) debido a que existen diferentes sitios de unión a estas sustancias, se ha sugerido que otros sitios de unión a BDZ podrían también ser afectados por las β -carbolicinas. En este trabajo, utilizando técnicas de biología molecular, se eliminaron 2 sitios de unión a BDZ en el receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$, lo cual permitió disecar el efecto que tienen estas al agregar el fármaco β -CCB en el modelo de expresión heterólogo de ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los resultados obtenidos sugieren que la β -carbolina β -CCB actúa sobre que el sitio de alta afinidad a BDZ como un inhibidor alostérico del receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ (de manera similar a lo que ocurre en el receptor neuronal) mientras que, en uno de los sitios de baja afinidad a BDZ el fármaco actúa potenciando el efecto de GABA sugiriendo que el efecto dual coexiste en el receptor nativo, sin embargo, para la β -CCB la resultante de este efecto es su potenciación. Sugerimos que la respuesta en un receptor específico a las β -carbolicinas dependerá de las subunidades que estén conformando a este receptor y probablemente de la naturaleza estructural de la β -carbolina involucrada.

Summary

Oligodendrocytes are responsible for the myelination of neuronal axons in the central nervous system. To promote the myelination process, the communication between neuron and oligodendrocyte is a crucial factor. In nature, there are many pathological conditions affecting the growth of the myelin sheet and because of that, studies like this bring important data for clinical use. One of the oligodendrocyte-neuron signaling molecules, is the gamma-amino butyric acid (GABA). The oligodendrocytes can sense this molecule with ionotropic (named GABA_A) and metabotropic (named GABA_B) receptors on their cellular membrane. In this study, I focused on the ionotropic GABA receptor known as receptor GABA_A with a subunit configuration of $\alpha_3\beta_2\gamma_1$. This combination has been studied in our lab and seems to be the most abundant receptor in optic nerve oligodendrocytes in rats. Particularly, drugs like β -CCB, an endogenous molecule, have an opposite effect on this receptor when compared to the receptor found in neurons, acting like benzodiazepines (BDZ) whereas in neurons is an inverse agonist of the receptor. One of the known sites for this drug is the classical benzodiazepine site and this fact suggests that other sites found for benzodiazepines might be acting as well when confronted with β -CCB. By using molecular biology techniques, we have eliminated 2 of the known sites for benzodiazepine binding. Using *Xenopus laevis* oocytes as heterologous model and β -CCB we have dissected the effect of this drug on some of these sites.

The high affinity BDZ site seems to be inhibiting GABA response similar to what happens with the neuronal receptor, while, a low affinity site for benzodiazepine has the potentiation effect that seems to be present only on oligodendroglial cells. This evidence suggests that there is dual effect on the native receptor, and when using β -CCB the resultant effect is a potentiation of GABA on the receptor. By analyzing these data, we propose that the effect of β -carbolines will depend on the proteins forming the receptor and the structural nature of the β -carboline.

Agradecimientos

A mis padres Jaime y Alma que me han apoyado en cada una de mis metas.

A mis tutores Rogelio y Edith cuya paciencia y conocimientos me han proporcionado las herramientas necesarias para poder completar este proyecto.

A mi hermano Eric, a mis amigos Fernando y Alfonso, cuya presencia me ha dado las fuerzas para seguir adelante aunque el camino se vuelva pedregoso.

A mi amiga Marisol con la cual he pasado grandes momentos.

A mis compañeros del laboratorio D-13 cuya presencia hizo más amena mi estadía en el laboratorio.

A mi comité tutorial, que me indicó los puntos donde mi trabajo podía mejorar y que me tuvo la paciencia para ver como mejoraba este trabajo.

A la Universidad Autónoma de México que forma estos programas para la formación superior de muchas personas en este país y brinda apoyo para que estos sean programas de calidad alrededor del mundo. (PAPIIT No. IN203519)

Al CONACYT (becario: 613285) que me brindo el apoyo para poder hacer una maestría en mi país.

A mi país México, que hace un esfuerzo inmensurable para que existan programas de educación como este.

Dedicatorias

Dedico este trabajo a mi familia y amigos que me han apoyado a lo largo de este camino.

Índice general

Resumen	V
Summary	VI
Agradecimientos.....	VII
Dedicatorias	VIII
Introducción	12
Antecedentes	17
Oligodendrocitos, características y funciones.....	17
Proceso de mielinización.....	18
GABA y receptor GABA _A	21
Modificadores alostéricos del receptor tipo GABA _A	24
β-carbolinas.....	25
Justificación.....	26
Hipótesis	27
Objetivo... ..	28
Objetivo particular... ..	28
Material y métodos... ..	29
Mutaciones de las subunidades del receptor.....	29
Transformación de células competentes	32
Extracción de DNA.....	32
Preparación de DNA... ..	32
Transcripción de cRNA... ..	35
Microinyección de RNA en un modelo heterólogo.....	35
Ensayo electrofisiológico con control de voltaje.....	36

Resultados	37
Mutagénesis dirigida de las subunidades del receptor GABA _A	38
Síntesis de cRNA codificantes de subunidades mutadas	39
Expresión heteróloga de subunidades mutadas en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	41
Efecto de la mutación en el sitio de alta afinidad a de BDZ sobre la potenciación por β -CCB.....	42
Mutación del sitio de baja afinidad a BDZ	42
Eliminación de los sitios de alta y baja afinidad a BDZ en el receptor oligoden- droglial	45
Discusión	47
Conclusiones	51
Referencias	52

I. Introducción

Los oligodendrocitos (OLs) son células de la neuroglía cuya función principal es la mielinización y remielinización de axones en las neuronas (Michalski y Kothari, 2015). Este proceso de mielinización es estimulado por la actividad eléctrica neuronal y modulado por diversos neurotransmisores, entre ellos el ácido γ -amino butírico (GABA) (Gundersen *et al.*, 2015). El GABA es, en el sistema nervioso central del adulto, el principal neurotransmisor inhibitorio de la actividad eléctrica neuronal, actuando al unirse a receptores específicos expresados en la membrana. Durante su desarrollo, las células precursoras de OLs (OPC) expresan receptores a GABA que son activados a través de conexiones sinápticas con axones. Cuando son aislados y mantenidos en cultivo, tanto los OPC como las células oligodendrogiales premyelinizantes, expresan receptores a GABA que permanecen en la membrana celular alrededor de 24 h. Sin embargo, estas células co-cultivadas en presencia de neuronas permite que la expresión de los receptores a GABA se vuelve estable y permanece durante varios días (Arellano *et al.*, 2016). Este comportamiento, hace suponer, que la expresión de los receptores a GABA en los OLs es de importancia en el proceso de contacto y reconocimiento con los axones, y/o en el inicio del fenómeno de mielinización. El trabajo realizado en los OLs en co-cultivo con neuronas muestra, además, que los receptores a GABA oligodendrogiales son de naturaleza diferente a los expresados comúnmente en las neuronas. En éste mismo sentido, estudios recientes muestran que la señalización gabaérgica regula la proliferación y diferenciación *in vivo* de los precursores de OLs en la sustancia blanca cerebelar (Zonouzi *et al.*, 2015). Utilizando un modelo de leucomalacia inducida por hipoxia, estos estudios muestran que después del episodio hipóxico existe una pérdida significativa de la entrada gabaérgica sináptica en los OPCs, los cuáles aumentan su tasa de proliferación y no logran diferenciarse en OLs mielinizantes, provocando hipomielinización. Por otro lado, Hamilton y colaboradores han descrito de manera muy detallada como afecta GABA a los procesos de migración de OLs y sus precursores. Entre los hallazgos de estos autores se encuentra que al bloquear el efecto de GABA en sus receptores ionotrópicos se da un aumento en la población de OLs y sus precursores, hay un incremento en la mielinización y se acorta la distancia internodal de las vainas de mielina (Hamilton *et al.*, 2017).

Dada la importancia que la señalización GABAérgica tiene en la mielinización, uno de los temas más importantes por definir es la identidad molecular de los receptores a GABA oligodendrogiales, así como sus características funcionales y farmacológicas. Los receptores a GABA del tipo GABA_A están formados por 5 subunidades que en conjunto forman un poro que permite el flujo de iones Cl⁻ a través de la membrana celular. En mamíferos existen 19 genes que codifican para las diferentes subunidades: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π , y ρ 1-3.

Evidencias farmacológicas y electrofisiológicas sugieren que el receptor GABA_A expresado en OL está constituido por las subunidades $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ (Arellano *et al.*, 2016; Ordáz, 2017). Este receptor, tiene características semejantes al receptor endógeno oligodendrogial, que como hemos mencionados arriba, difiere de los previamente caracterizados en neuronas los cuales están compuestos principalmente de las subunidades $\alpha_1\beta_2\gamma_2$.

La modulación alostérica es una característica intrínseca de los receptores GABA_A, y está bien ejemplificada por los efectos de compuestos que se unen al sitio de benzodiazepinas (BDZ) (Sieghart, 2014). Ligandos de varias clases químicas se unen a este sitio, y ejercen sobre la corriente de cloro activada por GABA, un espectro amplio de efectos como moduladores alostéricos, que va desde la modulación positiva a la modulación negativa. Este espectro farmacológico de las benzodiazepinas está determinado por la composición específica del GABA_AR, y principalmente de la participación de las subunidades α , β y γ (Olsen & Sieghart, 2008).

El sitio clásico de unión a BDZ está formado por aminoácidos que se encuentran en la interfase de los dominios extracelulares de subunidades α y γ (interfase $\alpha - \gamma$). Además de este sitio, considerado de alta afinidad a BDZ, se han identificado otros dos sitios de unión a estos fármacos. Uno de baja afinidad, localizado en la interfase $\alpha - \beta$ homólogo al sitio de unión a GABA, y el tercero también de baja afinidad, localizado en la interfase de región transmembranal de las subunidades $\alpha\beta\gamma$.

Otro ejemplo de fármacos moduladores del receptor, son las β -carbolinas. Esta familia de moléculas tiene como estructura principal el 9H-pyrido-[3,4- β]-indol, mejor conocido como

norharmina. Clásicamente, por la descripción de su acción en neuronas, estas sustancias se conocen como agonistas inversos del sitio de unión a BDZ, ya que inhiben la actividad por GABA del receptor GABA_A neuronal. En particular, la molécula n-Butil-P-Carbolina-3-Carboxilato (β -CCB), es una β -carbolina endógena cuyo sitio de unión conocido se encuentra en el receptor GABA_A en neuronas y corresponde con el sitio de mayor afinidad a BDZ (Peña *et al.*, 1986; Medina *et al.*, 1989). En neuronas, al igual que diversas β -carbolinas, la β -CCB inhibe el efecto de GABA sobre el receptor GABA_A, sin embargo, en OLs del nervio óptico actúa potenciando el efecto de GABA sobre su receptor (Arellano *et al.*, 2016).

Los antecedentes señalan que esta diferencia en la acción de las β -carbolinas podría deberse a una composición diferente del receptor oligodendroglial, y fue postulado que el receptor estaba compuesto de las subunidades $\alpha 3/\beta 2$ ó $\beta 3/\gamma 1$ ó $\gamma 3$ (Arellano *et al.*, 2016). Recientemente, en el laboratorio, se clonaron las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$, y $\gamma 1$ del receptor GABA_A de OLs, y posteriormente fueron co- expresadas heterológicamente en ovocitos de *Xenopus laevis* (Ordaz, 2017). Los receptores de esta composición presentaron características funcionales y farmacológicas que cumplen con las observadas en el receptor endógeno. Siendo este el caso, el receptor es un excelente candidato que podría corresponder con la farmacología expresada en los OLs. En el receptor GABA_A expresado heterológicamente en ovocitos se reprodujo el efecto potenciador del modulador β - CCB. Además, este efecto no fue antagonizado por flumazenil (FMZ), un potente antagonista clásico del sitio de unión de alta afinidad a BDZ. Esta evidencia sugiere que la β -CCB actúa a través de un diferente sitio modulador sobre el propuesto receptor GABA_A de OLs. Esta diferencia farmacológica es fundamental, ya que sugiere fuertemente que la acción potenciadora de la β -CCB, tiene un correlato estructural definido en la novedosa estequiometría del receptor oligodendroglial. Resulta entonces de la mayor importancia, el definir a nivel molecular, los posibles sitios de acción sobre el receptor GABA_A oligodendroglial, tomando en cuenta como antecedente su probable relación con aquellos sitios donde se sabe que actúan las BDZ.

Por lo tanto, en el presente trabajo se realizaron mutaciones puntuales en las secuencias codificantes de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$, y $\gamma 1$, que intervienen en la formación de los sitios de

alta y de baja afinidad para BDZ con el fin de determinar su efecto sobre la modulación alostérica de la β -CCB.

Antecedentes

Oligodendrocitos, características y funciones

La neuroglía es un conjunto de células que propician la homeostasis, así como la protección, y el soporte a las neuronas del sistema nervioso. Esta influye de manera directa sobre el funcionamiento e integración de los circuitos neuronales. Entre estas células se encuentran los OLs cuya función principal es la generación, mantenimiento y reparación de la vaina de mielina que recubre los axones de las neuronas (Bradl y Lassman, 2010).

Los OLs son componentes importantes en la materia blanca, aunque también se encuentran en la materia gris del sistema nervioso. Los OLs maduros presentan extensiones de su membrana plasmática las cuales culminan en la vaina de mielina que recubre segmentos del axón de neuronas vecinas a ellos (Figura 1).

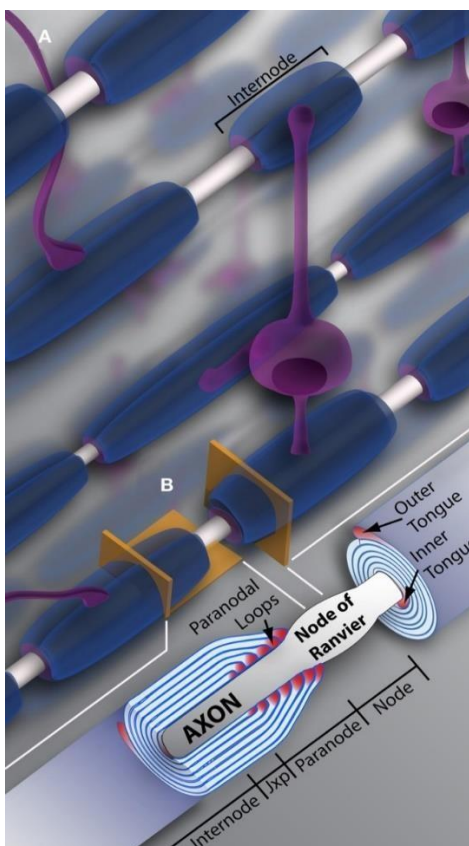


Figura 1. Esquema de los oligodendrocitos mielinizantes. De color morado se encuentran los oligodendrocitos, estos tienen extensiones dirigidas hacia varias neuronas que culminan en una vaina que recubre parte del axón neuronal. Entre cada vaina existe una parte descubierta de este axón que se conoce como nodo de Ranvier. En este nodo ocurre el intercambio iónico entre el medio intracelular y extracelular. Imagen tomada de Michalsky y Kothary, 2015.

Los OLs mielinizantes se diferencian a partir de los OPC. Estas últimas son células con capacidades de proliferación y migración muy extensa, dando origen a tres estados subsecuentes a lo largo de su diferenciación. Estos estados pueden ser identificados en el tiempo, por sus cambios morfológicos, y por la expresión de marcadores moleculares específicos en cada etapa. Estos tres estados son llamados los preoligodendrocitos, los OLs premielinizantes o inmaduros, y los OLs mielinizantes o maduros. La transición a través de estos estadios requiere la participación de moléculas diversas, tales como hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores como ATP, Glutamato y GABA.

Proceso de mielinización

La mielinización es un proceso en el cual las terminaciones axonales de las neuronas son recubiertas por múltiples capas de membrana proteolipídica denominada vaina de mielina. Esta vaina tiene como función principal aislar eléctricamente la membrana axonal del medio externo aumentando la resistencia membranal. Esta característica permite que la despolarización membranal de la neurona ocurra casi exclusivamente en los nodos de Ranvier. En consecuencia, en neuronas mielinizadas, la conducción eléctrica es más rápida y con un menor gasto energético.

La mielinización es un proceso muy dinámico que muestra una alta plasticidad y el patrón de mielinización que presenta cada neurona, le confiere identidad. Se ha sugerido que ésta es una estrategia para modular la comunicación, entre grupos o circuitos neuronales (Tomassy *et al.*, 2014).

El proceso de mielinización se lleva a cabo por los OLs en el sistema nervioso central y por las células de Schwann en neuronas del sistema nervioso periférico. Los OLs pueden ser clasificados morfológicamente por el grosor de la mielina con la que recubren el axón. Los oligodendrocitos de tipo I tienen una mayor cantidad de procesos y recubren delgadamente los axones. Por otro lado, los OLs de tipo IV son similares a las células de Schwann en cuanto a que recubren un solo axón y forman una vaina muy gruesa (Simons y Nabe, 2016).

Para que la mielinización se lleve a cabo, se requiere una comunicación bidireccional entre neuronas y OLs. Un mecanismo propuesto a través del cual se establecería en parte

dicha comunicación es por la liberación de exosomas (nanovesículas de 40 a 120 nm de diámetro) desde los OLs a los axones (Frühbeis¹ *et al.*, 2013). En su interior estas nanovesículas contienen distintas moléculas, tales como enzimas, mRNA y miRNA. Los exosomas al ser liberados son endocitados por neuronas y microglía que utilizan estas moléculas como parte de su propio metabolismo. Según estos estudios, las nanovesículas son liberadas por la activación de receptores ionotrópicos glutamatérgicos tipo AMPA y NMDA oligodendrogiales, a través de un mecanismo dependiente de la entrada de calcio extracelular. Previamente, ha sido demostrado que la actividad eléctrica neuronal provoca la liberación de ácido glutámico desde el axoplasma (Frühbeis² *et al.*, 2013), lo cual identifica un sistema de señalización que promueve el diálogo continuo neurona-OL.

Existen varios estudios en los que se proponen moléculas y neurotransmisores que actúan en diferentes etapas del proceso de maduración de OL y procesos del linaje oligodendrogial. Se sugiere que estas moléculas son protagonistas en la estrecha comunicación neurona-OL. Por ejemplo, Paez y cols. (2009) estudiaron la regulación de la homeostasia del Ca²⁺ en OPC. En este estudio demostraron que la migración de estas células desde los sitios de proliferación hasta su ubicación final en el cerebro estaría determinada por la entrada de este ion estimulada por la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje.

Estudios recientes muestran que los OLs, OPCs y células NG2 expresan receptores metabotrópicos e ionotrópicos a GABA. Estos trabajos también dan evidencia del posible papel que estos receptores tendrían en la interacción neurona-glía, regulando procesos fundamentales en el sistema nervioso como la actividad neuronal, diferenciación, migración, neuroprotección y la mielinización (Vélez-Fort *et al.*, 2012; Yoon y Lee, 2014; Arellano *et al.*, 2016).

El mal funcionamiento del proceso de mielinización en el humano tiene graves consecuencias para el funcionamiento del sistema nervioso. Entre algunas de las enfermedades desmielinizantes encontramos las leucomalacias. Estas enfermedades se caracterizan por daños en la materia blanca producidas por isquemia durante accidentes cerebrovasculares. Otras neuropatías relacionadas con una mielinización deficiente son: la encefalomiелitis aguda diseminada y la esclerosis múltiple. Esta última tiene una prevalencia de 1:1000 habitantes, en la población de adultos jóvenes en el mundo

Occidental (Bradl y Lassmann, 2013). Es por ello que conocer las interacciones que tiene la neurona con el oligodendrocito es vital para comprender el proceso de mielinización. Además, una vez conocido el proceso, poder modificar el comportamiento del sistema nervioso para abatir o controlar estas patologías.

En esta misma dirección, se han realizado experimentos con la intención de encontrar tratamientos que permitan modificar el proceso de mielinización. Uno de estos fue realizado por Zonouzi y colaboradores en el 2015. Utilizando un modelo de hipoxia crónica modificaron el proceso de mielinización al aumentar el GABA extracelular. Ratas que no recibieron el tratamiento tenían un serio déficit en la producción de la proteína básica de la mielina (MBP) y que era rescatado por el tratamiento con tiagabina. Esta última, es un fármaco que inhibe la acción del transportador de GABA 1(GAT-1). Esta estrategia permitió inferir que la molécula GABA está implicada en el proceso de mielinización. Sin embargo, no podría ser utilizada como parte de una terapia para varias de las patologías antes mencionadas pues el aumento de GABA en todo el sistema nervioso que no puede ser recapturado, tiene efectos adversos en todas las células sensibles al neurotransmisor. Por tanto, es necesario conocer la estructura y farmacología del receptor de GABA para diseñar una estrategia específica que permita actuar sobre el OL afectando lo menos posible otras células que requieran de GABA para su buen funcionamiento.

GABA y receptor GABA_A

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso adulto en mamíferos. Su función principal es la inhibición del potencial de acción neuronal al hiperpolarizar la membrana celular. Sin embargo, es importante mencionar que durante el desarrollo el neurotransmisor puede actuar despolarizando la membrana celular. Esto debido a que, durante su desarrollo las células del sistema nervioso tienen cambios en su potencial de equilibrio de membrana (Chan *et al.*, 2016). GABA es una molécula que funciona principalmente como un primer mensajero, es decir, los receptores celulares sensibles a esta molécula se encuentran en la membrana celular.

Los receptores a GABA se dividen en dos familias, los receptores GABA_B y GABA_A, los primeros, acoplados a proteínas G y los segundos, pertenecen a la familia de receptores con asas de cisteínas. Estos últimos, se caracterizan por tener 5 subunidades transmembranales las cuales conforman un canal iónico, que es selectivo a cloruro (Cl⁻). En mamíferos existen 19 genes (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π & ρ_{1-3}) que codifican las diferentes subunidades del receptor (Sieghart, 2014). Cada subunidad presenta un extenso dominio amino terminal extracelular, 4 dominios transmembranales con estructura de hélice α principalmente y un dominio carboxilo terminal al exterior de la célula (Schofield *et al.*, 1987; Sieghart, 2014) (Figura 2).

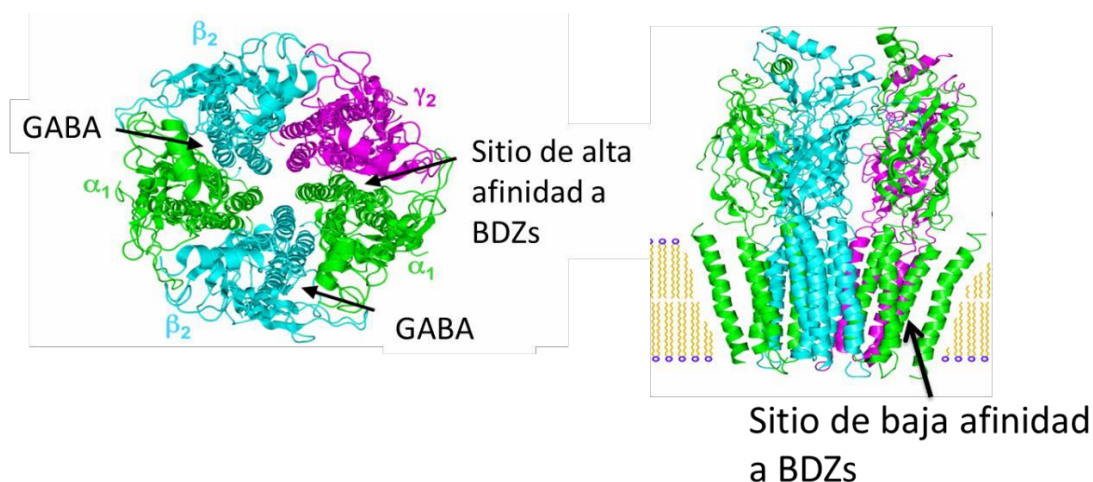


Figura 2. Representación del receptor GABA_A en un modelo *in silico*. Se puede observar una conformación del receptor con una combinación de subunidades típicas del linaje neuronal ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$). Además, se señalan los sitios donde ocurre la unión de BDZ al receptor.

A pesar de esta similitud en la estructura principal, cada una de las subunidades tienen una secuencia proteica distintiva que confiere afinidades diferentes hacia diferentes fármacos. Por ejemplo, receptores que son sensibles a concentraciones nanomolares de diazepam tienen en su composición subunidades α y γ . Por otro lado, otros fármacos como el indiplón actúan selectivamente sobre receptores que contienen subunidades γ_2 en su conformación. Receptores que contienen subunidades δ son mucho más sensibles a anestésicos generales, neuroesteroides y análogos de GABA, como garboxadol, que aquellos que contienen subunidades γ_2 (Olsen & Sieghart, 2008).

Existen diversos estudios que señalan la localización de los aminoácidos responsables de la unión del receptor a diferentes fármacos y neurotransmisores. Algunos ejemplos de estos son: El sitio de alta afinidad a BDZ que se encuentra en la interfase de los dominios extracelulares de las subunidades α_2 y γ_2 (Baur *et al.*, 2008, Middendorp *et al.*, 2015); y los sitios sensibles a anestésicos que se han localizado en cavidades en los dominios intermembranales de las diferentes subunidades que conforman al receptor (Sieghart, 2014).

Aunque el número de combinaciones posibles para la formación de este receptor es muy grande, considerando el número de subunidades existentes, solo ha sido posible probar la existencia de una decena de ellas (Olsen y Sieghart, 2008; Crestani y Rudolph, 2014). Para la mayoría de las neuronas del sistema nervioso central, la combinación más común del receptor es $\alpha_2\beta_{1-3}\gamma_2$ (Olsen y Sieghart, 2015). Este receptor neuronal permite una hiperpolarización de la neurona, retrasando el potencial de acción. Sin embargo, en el OL estos receptores muestran una farmacología distintiva y diferente a los neuronales, lo que sugiere la presencia de una combinación de subunidades distinta a la neuronal. Se realizó una batería de estudios funcionales y farmacológicos en el oligodendrocito. Comparado estos resultados con receptores expresados en modelos heterólogos se encontró una combinación de subunidades del receptor cuya farmacología se asemeja a la del receptor oligodendroglial endógeno. La composición propuesta es la de un receptor que contiene las subunidades α_3 , β_2 ó β_3 , γ_1 ó γ_3 (Arellano *et al.*, 2016; Ordáz, 2017).

Recientemente a través de la clonación de las subunidades del receptor expresadas en OLs y su expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*, fue posible corroborar que la composición del receptor formado por las subunidades $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ cumple en general con las características farmacológicas observadas en el receptor endógeno oligodendroglial (Arellano *et al.*, 2016, Ordáz, 2017). Gracias a estos hallazgos, es posible ahora estudiar este receptor y las interacciones farmacológicas que lo hacen diferente al receptor neuronal.

Modificadores alostéricos del receptor tipo GABA_A

La modificación alostérica de un receptor se define como un proceso donde una molécula se une a éste en un lugar diferente a su sitio activo (i.e., el sitio de unión a

GABA), modificando con esto la conformación espacial de la proteína y alterando su actividad (Motlagh *et al.*, 2014). El modulador alostérico no activa directamente a la proteína en su función principal que en este caso es la apertura del canal de Cl⁻.

La modulación alostérica es una característica conspicua de los receptores GABA_A y está bien ejemplificada por compuestos que actúan sobre el sitio de unión a BDZ. Ligandos de muchas clases químicas reconocen este sitio. Estos compuestos muestran un amplio espectro de eficiencia de modulación alostérica. Esta modulación puede ser desde positiva hasta negativa sobre la amplitud de la corriente de Cl⁻ activada por GABA. La farmacología de BDZ está determinada por las isoformas específicas de las subunidades α y γ del receptor. Se ha sugerido la existencia de 3 sitios de modulación para benzodiazepinas en el receptor neuronal y todos ellos actúan de manera positiva potenciando en diferentes grados la acción de GABA sobre su receptor neuronal.

El primer sitio responde a concentraciones nanomolares de BDZ y está formado por aminoácidos que se encuentran en la interfase entre las subunidades α - γ . Este sitio se encuentra cerca de una histidina (H) en la posición 101 de la subunidad α como lo demostraron los ensayos de foto-etiquetado. En efecto, empleando flunitrazepam con un grupo funcional sensible a la luz, se realizaron ensayos de fotoetiquetado. Una vez que ésta BDZ se unió al receptor, se provocaron destellos de luz que hicieron inestable al grupo funcional provocando su unión de manera covalente a estructuras que se encontraban cerca del sitio de unión. Después de una digestión parcial del receptor y una inmunoprecipitación se encontró que la molécula fotosensible se había unido, con una gran frecuencia, a una histidina en la posición 101 de la subunidad α (Duncalfe *et al.*, 1996). Al estudiar las diferentes subunidades α , se observó que la incorporación de las subunidades α 4 y α 6 al receptor le otorgaban insensibilidad a diazepam y a otras BDZ clásicas. Al comparar las secuencias de las diferentes subunidades se encontró que las subunidades α 1, α 2, α 3 y α 5 poseen una H en la posición 101 mientras que las subunidades α 4 y α 6 tienen una arginina (R). Al ser mutada la H a R, el GABA_AR pierde sensibilidad a BDZ (Benson *et al.*, 1998).

Los otros dos sitios de unión de BDZ son de baja afinidad y responden a concentraciones micromolares de estos fármacos. Uno de ellos está localizado en la interfase α - β y el otro

en la segunda región transmembranal de las subunidades α y β (Figura 2). Este último fue descubierto después de analizar la secuencia de la subunidad $\rho 1$ que es insensible a BDZ y compararla con la de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 2$ y $\gamma 2$. El análisis mostró la presencia de una isoleucina (I) en la posición 307 de la subunidad $\rho 1$ mientras que en la posición equivalente de las otras subunidades hay una serina (S) o una asparagina (N). Haciendo mutaciones para modificar la secuencia de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 2$ y $\gamma 2$ e incorporar una I, Walters y colaboradores observaron que el receptor resultante se vuelve insensible a altas concentraciones de BDZ. De la misma manera, mutaron la subunidad ρ cambiando la isoleucina por serina y el receptor resultante adquirió afinidad por BDZs. En conclusión, la combinación de mutaciones en los residuos $\alpha 1S269$, $\beta N265$ y $\gamma S280$ cada uno a isoleucina, elimina el sitio de baja afinidad sin afectar el sitio de alta afinidad (Walters *et al.*, 2000).

Otros moduladores alostéricos del receptor son los neuroesteroides. Estos son fármacos que a bajas concentraciones actúan como moduladores alostéricos positivos, pero que a altas concentraciones pueden abrir de manera directa el canal de cloro. Estos tienen sitios de activación en el primer dominio transmembranal de subunidades α que permite su acción como modulador alostérico y un segundo sitio localizado en la interfase de unidades α - β justo debajo del sitio de unión a GABA, el cual, permite la apertura directa del canal de cloro. Entre los neuroesteroides más comunes se encuentran el 3α -hidroxi- 5α dihidroprogesterona y la 3α - 5α - tetrahidrodeoxicorticosterona (Sieghart, 2014).

Otra familia de moduladores del receptor GABA son los barbitúricos, moléculas derivadas del ácido barbitúrico. Estas sustancias tienen efectos diferentes en el receptor $GABA_A$ que dependen de su concentración. En concentraciones bajas actúan como moduladores alostéricos, a concentraciones intermedias pueden abrir directamente el canal de cloro y a muy altas concentraciones pueden bloquear este mismo canal (Brandon y Fisher, 2006). Sus sitios de unión se identificaron por medio de técnicas de fotoetiquetado y se pudo observar que estos se encuentran en las interfaces de los dominios transmembranales de las subunidades α y β , debajo del sitio de unión a GABA (Sieghart, 2014).

Otros moduladores alostéricos del receptor, son las β -carbolinas. Estas son moléculas

heterocíclicas cuya estructura primaria está compuesta de un grupo indol fusionado con un grupo pirimídico. Farmacológicamente, estas sustancias se conocen como agonistas inversos del sitio de unión a las BDZ y, por lo tanto, disminuyen el efecto de GABA en el receptor GABA_A neuronal.

Las β-carbolinas

Las β-carbolinas son un conjunto de moléculas derivadas de la 9H-pirido-3,4-β indol (*Norharmina*). Estas se encuentran naturalmente en muchos organismos vivos. Un ejemplo es la harmina que se encuentra en plantas como la *Banisteriopsis caapi* que son utilizadas para la fabricación de bebidas herbales con efectos alucinógenos.

Algunas de las β-carbolinas que se encuentran en el ser humano son la pinolina y la triptolina (Callaway et al., 1994; Rommelspacher et al., 1977). La pinolina es parte del metabolismo de la melatonina y, por tanto, tiene una relación con el ciclo sueño-vigilia, mientras que la triptolina es parte del metabolismo del aminoácido triptamina. De la misma manera, la β-CCB (n-Butil-P-Carbolina-3-Carboxilato), es una betacarbolina endógena (Medina, 1989), y se ha identificado que uno de sus sitios de unión en el receptor GABA_A en neuronas, es el sitio de alta afinidad a BDZ.

Las rutas metabólicas en las cuales se da la formación de estas moléculas pertenecen principalmente a la síntesis y modificación de aminoácidos aromáticos y nitrogenados (Crestani *et al.*, 1994). Estas biomoléculas reaccionan con carbonilos y ácidos cetónicos (en especial piruvato y acetaldehído) cerrando el heterociclo donde se encuentra el nitrógeno libre por medio de una reacción de Schiff (Laviță *et al.*, 2016; Herraiz *et al.*, 2014) (Figura 3).

A nivel conductual las β-carbolinas tienen un efecto alucinógeno que es explicado principalmente por la inhibición de la monoamino-oxidasa A (MAO-A). Además de, efectos convulsivantes y ansiogénicos debido a su acción en el receptor GABA_A neuronal. Este efecto es debido a que decrementan la acción de GABA sobre el receptor, característica que se repite con muchos integrantes de la familia de las β- carbolinas incluyendo a la β-CCB. Siendo que el OL expresa un receptor GABA_A, en el laboratorio se utilizó esta β-CCB

para observar su efecto sobre el receptor, y se observó que en OLs del nervio óptico (Arellano *et al.*, 2016, Ordáz 2017) este fármaco incrementó de manera importante el efecto sobre la corriente de cloro producida por GABA al unirse al receptor, una acción opuesta a lo que se había descrito para el receptor neuronal.

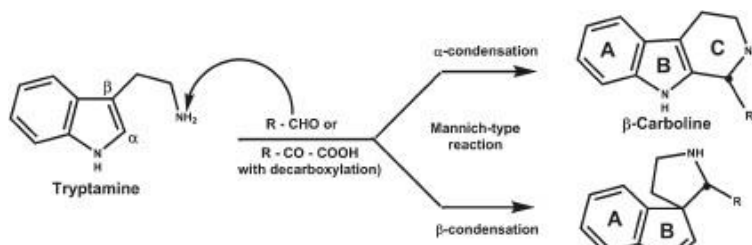


Figura 3. Síntesis bioquímica de una triptolina. Esta molécula es una β -carbolina que forma del ciclo de la triptamina. Imagen tomada de Lavița *et al.*, 2016.

Debido a que la β -CCB es una sustancia endógena y se une en el sitio de alta afinidad a BDZ, se ha hipotetizado que esta sustancia es el ligando endógeno para los sitios de BDZ y su función consiste en modular el efecto que tiene GABA sobre los diferentes linajes celulares que tienen receptores para éste.

Recientemente en nuestro laboratorio, las subunidades $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ del receptores a GABA_A fueron clonadas de OLs del nervio óptico y posteriormente expresadas heterológamente en ovocitos de *Xenopus laevis*. En este receptor se observó que la β -CCB actúa como un potente modulador alostérico positivo de la respuesta a GABA de manera similar a lo observado en el receptor endógeno de OLs. Además, fue demostrado que esta respuesta no fue antagonizada por flumazenil (FMZ), un potente antagonista clásico del sitio de unión de alta afinidad a BDZ, sugiriendo que la β -CCB actúa a través de un nuevo sitio modulador sobre el receptor GABA_A de OL (Ordaz, 2017).

En el presente trabajo se realizaron mutaciones puntuales en las secuencias codificantes de las subunidades α_3 , β_2 , y γ_1 . Estas corresponden con los sitios de alta y baja afinidad para BDZ. La finalidad de estas mutaciones es determinar las consecuencias de la modificación del receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ sobre la modulación alostérica de la β -CCB.

Justificación

El receptor GABA_A caracterizado en neuronas, es modulado alostéricamente de manera negativa por la β -CCB a través del sitio de unión a BDZ. Sin embargo, el posible receptor GABA_A de OLs compuesto por las subunidades $\alpha_3\beta_2\gamma_1$, es modulado positivamente por la β -CCB. Este efecto no se modifica al usar el agonista flumazenil el cual se une al sitio clásico de unión de las BDZ. Esta observación sugiere que en el receptor GABA_A de OLs existe un sitio de unión a la β -CCB diferente al sitio o sitios de unión de las BDZ.

II. Hipótesis

Mutaciones puntuales en las secuencias codificantes de las subunidades $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ del receptor GABA_A, implicadas en la unión a BDZ, afectarán la modulación de la β -carbolina β -CCB.

III. Objetivo.

Identificar los sitios de unión a β -CCB en el receptor de OLs conformado por las subunidades $\alpha_3\beta_2\gamma_1$.

IV. Objetivos particulares

I) Realizar una mutación en la secuencia codificantes de la subunidad α_3 que elimine el sitio clásico de alta afinidad para BDZ al cambiar la histidina (H) en la posición 126 a arginina (R).

II) Mutar las secuencias codificantes de las subunidades α_3 , β_2 y γ_1 en las posiciones respectivas Serina (S) 294, asparagina (N) 264, y S282 que eliminan el sitio de baja afinidad para diacepam.

III) Expresar heterológamente las subunidades mutadas y las silvestres en ovocitos de *Xenopus laevis* y caracterizar el efecto modulador de la β -CCB, tanto para el sitio de alta afinidad como para el de baja afinidad para benzodicepinas

Materiales y métodos

Mutaciones de las subunidades del receptor

Se diseñaron pares de oligonucleótidos que contienen la secuencia de cada una de las subunidades del receptor GABA_A modificando el codón que corresponde al aminoácido que se pretende cambiar en la secuencia proteica. Estos oligonucleótidos se presentan a continuación:

Subunidad del receptor	Secuencia	Cambio
<i>Alfa 3 (H126)</i>	Sentido: ggactccagataccttctc aga acgg	Histidina por
	Antisentido: gtgagccactgatttttaccg ttct gaag	Arginina
<i>Alfa 3 (S294I)</i>	Sentido: gttctcaccatgaccacctg atc atcag	Serina por
	Antisentido: ggtaaagagtttctggcactgat gat caagg	Isoleucina
<i>Beta 2 (N264I)</i>	Sentido: cctgacgatgaccacaatc atc accc	Asparagina por
	Antisentido: gagtctcccggagatgggt gat gatt	Isoleucina
<i>Gamma 1 (S282I)</i>	Sentido: cggtttgactatgacaaccctc atc aca	Serina por
	Antisentido: gaaaccttaggtaaagattttctagcgatt gtg atgag	Isoleucina

Tabla 1: Oligonucleótidos diseñados para provocar la mutación de las secuencias de las subunidades del receptor GABA_A. En paréntesis se señala el aminoácido y la posición en la que se encuentra dentro de la secuencia proteica del fenotipo silvestre. En la segunda columna de color rojo se señala el triplete de nucleótidos mutados y la consecuencia de este cambio en la tercera columna.

Una vez diseñados estos oligonucleótidos se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como moldes las secuencias codificantes de las subunidades correspondientes previamente clonadas en el plásmido pXENEX (Jeziorski *et al.*, 1998). Este plásmido tiene un gen de resistencia a la ampicilina que funciona como un control positivo de la introducción del plásmido y el promotor T7 necesario para la transcripción *in vitro* de la secuencia insertada en el plásmido (Figura 4).

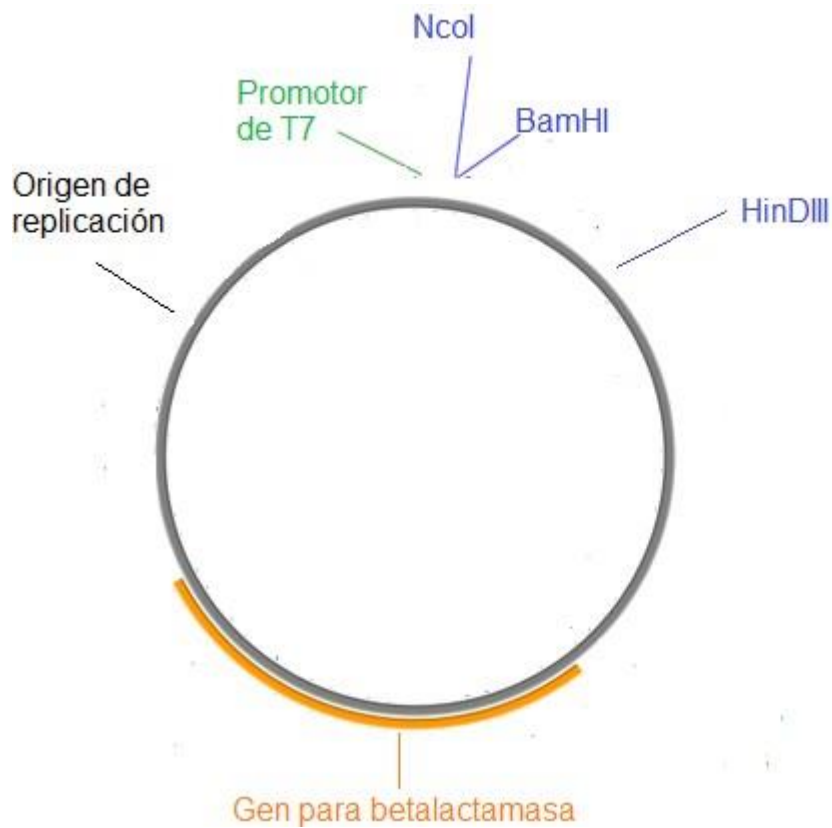


Figura 4. Mapa de restricción del plásmido pXENEX. De color naranja se muestra el gen de resistencia a la ampicilina, se señala el origen de replicación y el promotor T7. Además, se muestran las regiones donde se encuentran los sitios de restricción que se utilizaron en estos experimentos. Modificado de Dong *et al.* 2004.

Para obtener la secuencia doble mutante de la subunidad $\alpha 3$ se utilizaron como molde los plásmidos obtenidos con la mutación en histidina y los oligonucleótidos con la mutación en serina para realizar la PCR. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
Desnaturalización	95 °C	10 segundos
Alineación	55 °C	45 segundos
Extensión	68 °C	5 minutos
Extensión final	68 °C	10 minutos

Se utilizó como protocolo de PCR el indicado para la enzima Pfu Ultra de ThermoScientific. Esta proteína es una DNA polimerasa con un alto grado de fidelidad lo cual disminuye la probabilidad de que ocurra una mutación durante la reacción de síntesis.

Una vez completada la PCR, se trató al producto con la enzima DpnI, que es una endonucleasa la cual corta DNA que se encuentra metilado. Esto con el propósito de eliminar el plásmido que sirvió de molde.

Transformación de células competentes

Se utilizaron células competentes XL-Blue. La transformación se realizó por medio de un protocolo de choque térmico en el cual se agregaron 5 μ L del producto de PCR a las bacterias, se dejó reposar en hielo durante 5 minutos y se colocaron a 42 °C durante 1 minuto. Finalmente, se les agregó 400 μ L de medio Luria y se incubaron por al menos 30 minutos a 37 °C. Después, las bacterias se propagaron en medio sólido con ampicilina.

Extracción de DNA

Se seleccionaron colonias aisladas y se sembraron en 25 mL de medio Luria con ampicilina a una concentración de 80 µg/mL. Las bacterias se crecieron en agitación a 37 °C por 16 horas. Posterior a esto, las bacterias fueron sedimentadas por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos y resuspendidas en 2 mL de una solución que contiene Tris 25mM, Glucosa 50 mM y EDTA 10 mM. Luego las células fueron lisadas con 4 mL de una solución de Dodecil sulfato de sodio 1% e Hidróxido de Sodio 0.2 N y neutralizada con 3 mL de una solución amortiguadora de acetatos (Acetato de potasio 5M 60 mL, ácido acético glacial 11.5 mL, H₂O c.b.p. 100mL, pH 8). Esta última se mezcló por inversión 5 veces y se dejó incubando en hielo durante 5 minutos.

Al término de ese tiempo se centrifugó durante 15 minutos a 9300 rpm y 4°C y el sobrenadante fue precipitado con 5.5 mL de isopropanol a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó la mezcla a 9300 rpm durante 10 minutos. El sedimento obtenido fue lavado con etanol al 80% y posteriormente resuspendida en 1 mL de solución TE (Tris 10mM, EDTA 1mM) y 5 µL de RNAsa (10 mg/mL) durante 30 minutos a 37°C. Al final de la incubación se precipitó el plásmido utilizando una solución de Polietilenglicol 13% P/V, NaCl 1.6 M e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos y el sedimento se lavó con etanol al 80 % y posteriormente fue resuspendido en 150 µL de agua grado MQ.

La calidad de los plásmidos obtenidos fue corroborada por medio de 3 técnicas. En primer lugar, se realizó un análisis espectrofotométrico de la muestra para conocer la concentración y pureza aparente del plásmido. En segundo lugar, se realizó una electroforesis del plásmido para medir su integridad y corroborar que el peso molecular del plásmido corresponde al peso molecular teórico. Y finalmente, los plásmidos obtenidos fueron enviados a secuenciar: El análisis de las secuencias se llevó a cabo con el programa Sequencher 5.1 (Versión Demo).

Preparación del DNA para transcribir in vitro

Una vez verificados los plásmidos, se llevó a cabo una reacción de restricción para

linealizar el plásmido y poder llevar a cabo de manera eficiente su transcripción. Las enzimas utilizadas para cada subunidad fueron las siguientes:

Subunidad	Enzima de restricción
α_1 y α_3	HindIII
β_2	Sph I
γ_1 y γ_2	HindIII

Se realizó la reacción de restricción conforme a los protocolos de cada una de las enzimas y se analizó en un gel de agarosa al 1%. Una vez confirmado se procedió a purificar este DNA por medio de extracción con fenol.

Para ello, la mezcla de restricción se llevó a 200 μ L de agua y se mezcló con un volumen igual de solución de Fenol saturado en TRIS y se agitó vigorosamente. La mezcla se centrifugó a velocidad máxima por 4 minutos. Se rescató la fase acuosa y a ésta se le agregó un volumen igual de cloroformo. Se agitó vigorosamente y se centrifugó en las mismas condiciones rescatando la fase acuosa. A esta fase acuosa se le agregó acetato de sodio a una concentración final de 0.3M y dos volúmenes de etanol y se almacenó al menos 2 horas a -20 °C. Al término de este tiempo se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 80% y se centrifugó en las mismas condiciones. El sedimento se disolvió en 20 μ L de H₂O grado MQ libre de RNAsas. Se determinó la concentración de DNA por espectrofotometría.

Transcripción in vitro

Se utilizó el protocolo del kit mMessage mMachine de *Thermoscientific*, utilizando 1 μ g de DNA linearizado. La reacción se incubó durante 2 horas a 37°C y luego se agregó DNAsa incubando nuevamente durante 15 minutos. Finalmente se paró la reacción con la solución de acetatos de amonio provistas en el kit y la mezcla se llevó a un volumen final de 150 μ L. El RNA sintetizado fue purificado por medio de una extracción con fenol saturado en agua y cloroformo a una proporción 1:1 y centrifugado a 14000 rpm durante 5

minutos. Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con un volumen igual de cloroformo y nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones. Se volvió a recuperar la fase acuosa y el RNA fue precipitado con un volumen igual de isopropanol incubando al menos 15 minutos a -20 °C. Al término de este tiempo se centrifugó y el sedimento se lavó con 1 mL de etanol al 80%. Finalmente, el sedimento se disolvió en 21 μ L de H₂O grado MQ libre de RNAsas. La calidad del RNA se verificó por electroforesis utilizando un gel de agarosa 1.4% y por espectrofotometría.

Microinyección

Se separaron ovocitos de *Xenopus laevis* del estadio VI y fueron colocados en una solución de Barths normal (88 mM NaCl, 7 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 5 mM HEPES, y gentamicina 70 μ g/ml). Se incubaron a 18 °C durante 24 horas, para su posterior inyección con el correspondiente cRNA. Para la microinyección se mezcló el mismo volumen de una combinación de tres subunidades que formarían el receptor. En cada ovocito se microinyectaron 50 nL de las mezclas de RNA. Los ovocitos microinyectados fueron incubados nuevamente a 18 °C en solución de Barths durante 24 horas previo a su monitoreo electrofisiológico.

Control de voltaje

Para poder estudiar el efecto que tiene la apertura del receptor GABA_A se utilizó la técnica de control de voltaje con 2 electrodos (Miledi, 1989; Arellano y Miledi, 1995). Esta técnica fue ideada por Kenneth Steward Cole y George Marmont en 1947, y permite medir la corriente transmembranal controlando en un valor fijo su potencial.

El arreglo experimental requiere de la inserción de 2 microelectrodos (con resistencia de 1 M Ω) en el ovocito. Uno de estos electrodos registra el voltaje de la membrana mientras que el otro inyecta corriente eléctrica al interior de la célula para mantener el potencial de membrana en -60 mV. Finalmente, un tercer electrodo que se encuentra en el baño registra la corriente eléctrica que pasa a través de la membrana, y que corresponde al paso de corriente por la apertura de canales iónicos en la membrana, en este caso activados por GABA en el medio extracelular.

Para hacer estos experimentos se utilizó el equipo GeneClamp 500B (Axon Inst., CA,

EUA). La señal de corriente fue capturada utilizando el osciloscopio Gould (D50- 602) y también fue almacenada digitalmente utilizando el convertidor A/D Digidata 1200 y una PC con el set de software pClamp versión 9.0.

Los ovocitos después de 72 horas de la inyección con el cRNA fueron colocados, uno a uno, en una cámara de perfusión continua (10 mL/min) de solución Ringer. Los fármacos utilizados en este trabajo fueron disueltos en esta misma solución y administrados por perfusión. Al momento de hacer el registro, se realizó una perfusión con solución Ringer por 10 segundos con el fin de establecer el valor basal de corriente y monitorear la resistencia de membrana de las células. Después de este tiempo se aplicó por lo regular 10 μ M GABA (60 segundos) para obtener el valor control de activación de las respuestas en esta concentración del agonista, después de un lavado de 180 segundos, se aplicó alguno de los fármacos moduladores de la respuesta, e.g., diazepam o β -CCB, preincubando las células con el fármaco por 20 segundos, esta fase de preincubación permite que el fármaco se una al receptor, y estarían ocupados al momento en que el fármaco se co-aplica con el GABA. En el receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ silvestre, 10 μ M GABA se encuentra en un valor de dosis efectiva cercana al 30% (Ordaz, 2017; Ordaz *et al.*, 2019) lo cual permite observar los efectos de fármacos moduladores positivos sin que se llegue a la saturación del receptor. Esta co-aplicación se realizó durante 40 segundos, tiempo después del cual se retiró la solución y se lavó al ovocito con la solución Ringer durante 180 s, después de este lavado se realizó una tercera aplicación conteniendo solo el agonista para poder evaluar la reversibilidad de los efectos, cabe mencionar que en todos los casos estudiados los efectos fueron por completo reversibles.

En una primera etapa se realizaron los experimento que corresponden a los receptores $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ WT, α_3 (H126R) $\beta_2\gamma_1$ y α_3 (S294I) β_2 (N264I) γ_1 (S281I) observando el efecto que tiene el diazepam sobre estos. Al realizar entonces los registros electrofisiológicos en los ovocitos, en el mismo día se hicieron experimentos en las tres construcciones utilizando el diazepam como modulador alostérico. Esto se realizo 3 veces, y en cada ocasión utilizando los ovocitos de una rana distinta.

En la segunda etapa se realizaron los experimentos correspondientes a los receptores antes mencionados utilizando como modulador alostérico a la β -CCB. De la misma manera se hicieron los experimentos de manera que al hacer las repeticiones de estos, se

utilizaran ovocitos provenientes de ranas diferentes.

Finalmente se realizaron los experimentos correspondientes a ovocitos que expresaron el receptor α_3 (H126R,S294I) β_2 (N264I) γ_1 (S281I). De este último no hay datos hasta el presente, por lo que, los datos que se obtuvieron de este fueron comparados con los datos obtenidos para el receptor silvestre en las etapas 1 y 2.

Análisis de datos

Se obtuvieron las intensidades de corriente en presencia GABA solo o del GABA en co-aplicación del fármaco de interés para cada experimento. Para hacer las comparaciones correspondientes se obtuvo la potenciación relativa de GABA (I_{GABA}). Este valor fue normalizado utilizando la siguiente ecuación:

$$I = \frac{I_e}{I_0} \times 100$$

Donde I_e se refiere a intensidad de corriente de un ovocito en presencia de GABA y un fármaco modulador alostérico, mientras que I_0 se refiere a la intensidad de corriente del mismo ovocito solo en presencia de GABA.

Una vez obtenidos estos resultados para los receptores mutantes y silvestres, se realizó el análisis estadístico para observar si existen diferencias significativas entre ellas. En todos los casos las comparaciones estadísticas realizadas fueron pruebas t de 2 muestras independientes.

Resultados

Mutagénesis dirigida de las subunidades del receptor GABA_A

Con el fin de obtener secuencias de DNA codificantes de las subunidades α_3 , β_2 , ó γ_1 con mutaciones en los sitios de unión de BDZ, se realizaron ensayos de PCR con oligonucleótidos que contenían las mutaciones en los sitios deseados y como molde, plásmidos donde previamente se habían clonado las secuencias codificantes de dichas subunidades. Como se muestra en la Figura 4, una banda de amplificación del tamaño adecuado fue obtenida para las secuencias codificantes de las subunidades α_3 (S294), β_2 (N264) y γ_1 (S282). Resultados similares se obtuvieron para las otras subunidades.

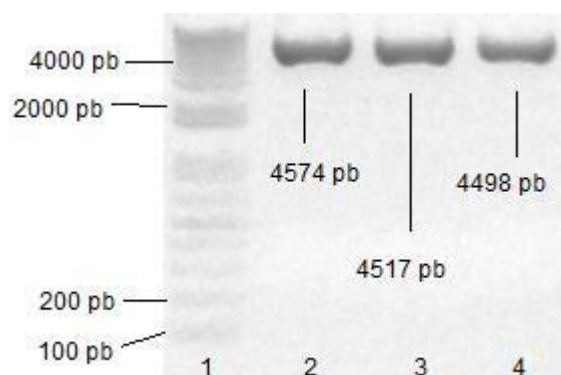


Figura 4. Análisis de los productos de amplificación. carril 1) marcador de pesos moleculares (1 Kb plus, Invitrogen). Carriles 2-3) productos de PCR de las subunidades mutantes de α_3 (S294), β_2 (N264) y γ_1 (S282) respectivamente.

Una vez amplificadas las secuencias de interés, se procedió a eliminar el plásmido molde empleando la enzima DpnI y posteriormente se transformaron bacterias competentes. Se aislaron colonias candidato de las cuales se obtuvieron los plásmidos correspondientes que fueron analizados por secuenciación (Figura 5).

El análisis de las secuencias mostró que las mutaciones deseadas fueron incorporadas en las secuencias codificantes de las subunidades α_3 , β_2 , ó γ_1 . En la figura 5 se muestra como ejemplo la secuencia parcial de la subunidad α_3 donde se distingue la incorporación de la mutación.

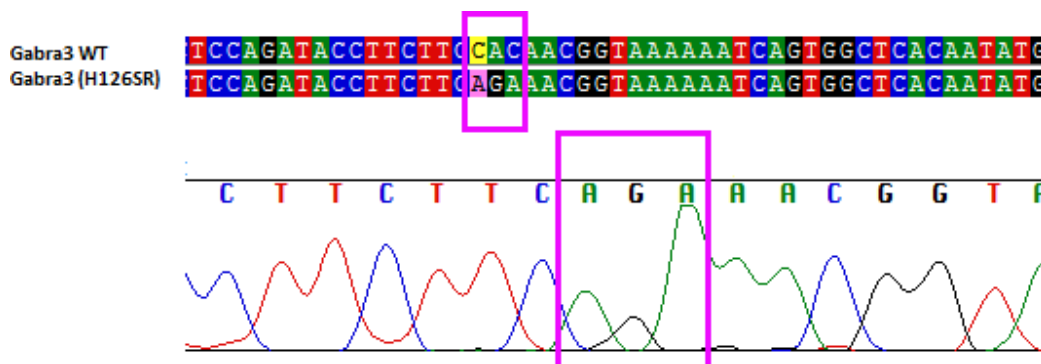


Figura 5. Secuencia parcial de la subunidad alfa 3 mutada clonada en el plásmido PXENEX. En el recuadro morado se puede observar que la secuencia original CAC se mutó a AGA.

Síntesis de cRNA codificantes de subunidades mutadas

Después de verificar las secuencias, los plásmidos donde fueron incorporadas las mutaciones se digirieron con enzimas de restricción como se describe en materiales y métodos con el fin de linealizarlos y posteriormente usarlos como molde en ensayo de transcripción *in vitro*. En la Figura 6 se muestra como ejemplo el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los cRNA de las subunidades α_3 , y β_2 obtenidos empleando esta estrategia. Se puede apreciar una sola banda de RNA sin trazas de degradación lo que muestra la buena calidad del RNA.

Una vez verificada la calidad del RNA codificante de cada una de las subunidades, se procedió a microinyectarlo en ovocitos de *Xenopus laevis*.

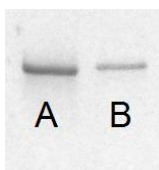


Figura 6. Electroforesis de RNA transcrito de 2 diferentes subunidades del receptor GABA_A. A) cRNA de la subunidad α_3 (H126R), B) cRNA de la subunidad γ_2 (N294I)

*Expresión heteróloga de subunidades mutadas en ovocitos de *Xenopus laevis**

El primer grupo de experimentos estuvo encaminado a estudiar el efecto de mutar el sitio clásico de unión a BDZ sobre la potenciación del receptor GABA_A provocada por la β -CCB. Para ello, ovocitos que fueron microinyectados previamente de 48-72 horas con 50 nL de cRNA (1 ng/nL) fueron monitoreados empleando la técnica de control de voltaje con dos electrodos como se describió en la sección de Métodos. Los ovocitos fueron co-inyectados con los cRNA de las subunidades $\beta_2\gamma_1$ silvestres (WT) junto con el de la subunidad α_3 silvestre, o en lugar de ésta, con la α_3 mutada H126R. Esta histidina se encuentra en el dominio extracelular de la proteína, y se posiciona en la interfase entre la subunidad α y la subunidad γ . Algunos estudios in silico indican que esta histidina tiene una función de posicionamiento en el receptor, pues gracias a interacciones de tipo de emparejamiento π (π stacking) permite que los fármacos se acomoden en el receptor desarrollando su función (Bergmann *et al.*, 2013).

Para verificar que los receptores expresados en los ovocitos corresponden con las características previamente descritas (Middendorp *et al.*, 2015), fueron entonces realizados los siguientes experimentos, donde fueron co-aplicados el diazepam y el GABA mientras las respuestas fueron monitoreadas electrofisiológicamente.

Especie(Tratamiento con diacepam)	N (# de ranas)	n(# de ovocitos)
$\alpha_3\beta_2\gamma_1$ WT	3	3
α_3 (H126R) $\beta_2\gamma_1$	3	3
α_3 (S294I) β_2 (N264I) γ_1 (S281I)	4	4
Especie (Tratamiento con β -CCB)	N (# de ranas)	n(# de ovocitos)
$\alpha_3\beta_2\gamma_1$ WT	3	5
α_3 (H126R) $\beta_2\gamma_1$	4	8
α_3 (S294I) β_2 (N264I) γ_1 (S281I)	5	8
α_3 (H126R,S294I) β_2 (N264I) γ_1 (S281I)	2	4

Tabla 2: Experimentos realizados indicando el número de ovocitos (n) y el de ranas (N) utilizados.

Efecto de la mutación en el sitio de alta afinidad a BDZ del receptor sobre la potenciación por β -CCB

Ya que el efecto de la mutación H126R fue caracterizada en los receptores neuronales, que contienen la subunidad γ_2 , quisimos determinar si el receptor oligodendroglial mutado compartía las características previamente descritas para el neuronal. Para esto fueron realizados los experimentos de co-aplicación de diacepam y GABA. La concentración de GABA utilizada fue de 10 μ M, la cual se encuentra por debajo de la concentración media efectiva (EC_{50}) como se ha mostrado previamente (Ordaz, 2017), esto permite observar el efecto de fármacos sin que exista un enmascaramiento por saturación de los receptores. También el diacepam fue aplicado a una concentración de 100 nM, esto evita la activación de los sitios de baja afinidad a BDZ. En estos experimentos el potencial de reposo promedio que presentaron los ovocitos estuvo alrededor de -30 mV, éste es un valor que corresponde con el observado en otros estudios (Arellano & Miledi, 1993).

Como se observa en la figura 7, los ovocitos silvestres tuvieron, en promedio, una corriente máxima de 213 ± 62 nA activada por GABA, mientras que los ovocitos mutantes para el sitio de alta afinidad presentaron una corriente máxima de 283 ± 70 nA. En el receptor silvestre, la co-aplicación con GABA y diacepam potenció la corriente máxima provocada por el neurotransmisor, mientras que, según lo esperado, el efecto potenciador de diacepam se perdió en los ovocitos co-inyectados con el cRNA mutado H126R (Benson

et al., 1998). Este resultado evidenció que, al igual que el receptor neuronal, el receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ tiene un sitio potenciador de alta afinidad a BDZ que se pierde al introducir la mutación H126R en la subunidad α_3 .

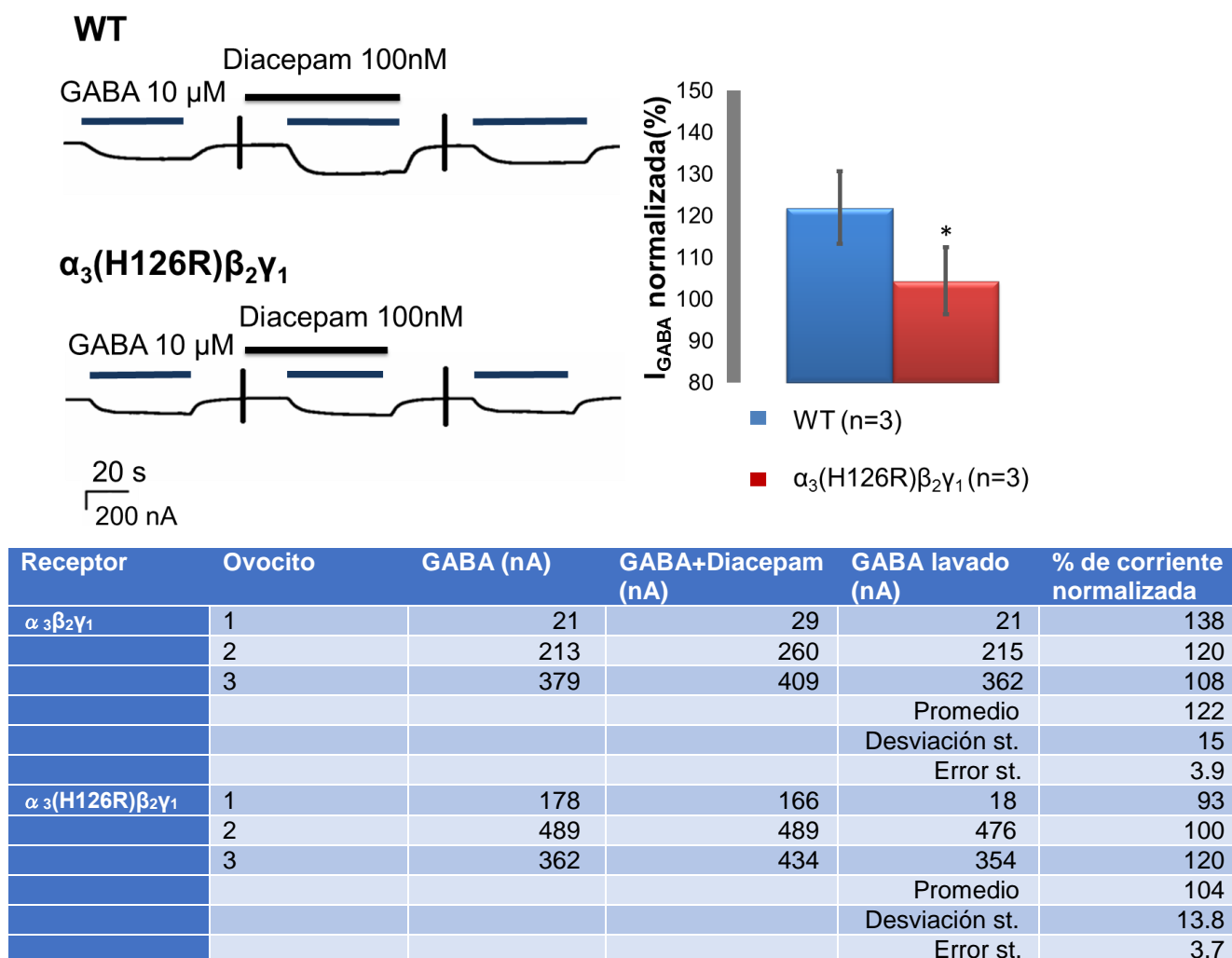
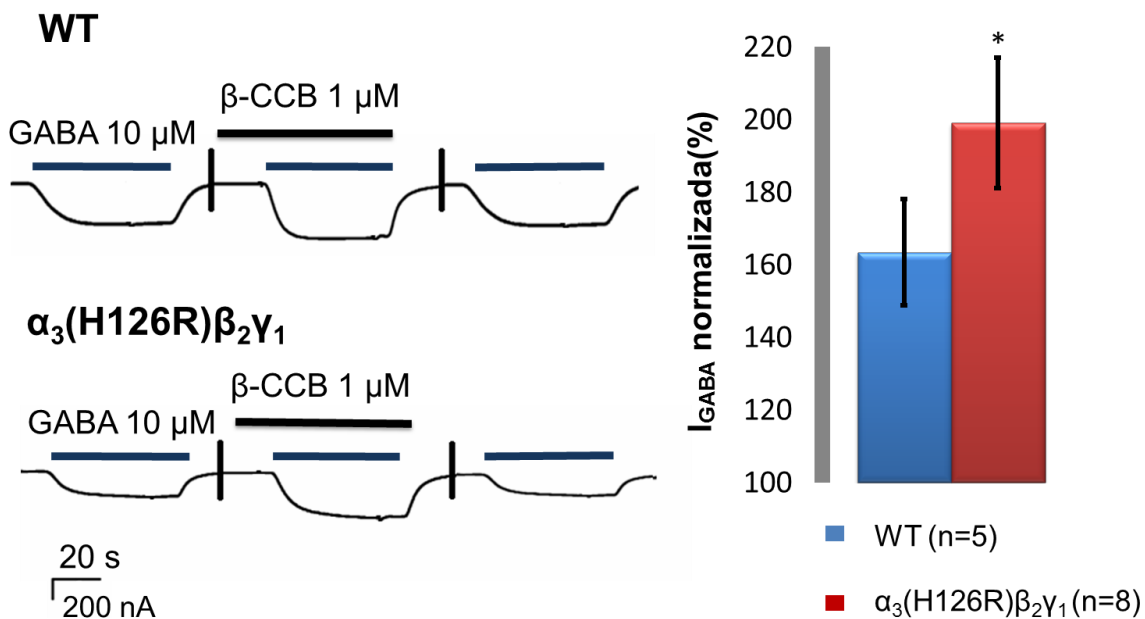


Figura 7. Efecto de diazepam sobre el receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ silvestre (n=3, N=3) y el receptor mutante H126R de α_3 (n=3, N=3). Se puede observar tanto en los registros como en el gráfico que el receptor mutante pierde la potenciación mediada por diazepam. La diferencia entre los grupos es significativa (prueba t de 2 muestras independientes, p=0.049). En la tabla se encuentran los valores de intensidad de corriente de cada experimento.

Después de corroborar que la mutación en la subunidad α_3 elimina el sitio de alta afinidad a BDZ, se realizaron experimentos para determinar el efecto de co-aplicación con la β -CCB sobre ese receptor. En trabajos anteriores del laboratorio (e.g., Ordaz, 2017) fue determinado que el EC50 para el efecto potenciador de β -CCB es de alrededor de 1 μM , el uso de esta concentración permite observar el efecto del fármaco, al tiempo que se

reducen las probabilidades de que exista un efecto de enmascaramiento al usar mayores concentraciones, lo cual podría complicar el análisis de la disección de los sitios de unión al receptor.



Receptor	Ovocito	GABA (nA)	GABA+ β -CCB (nA)	GABA lavado (nA)	% de corriente normalizada
$\alpha_3\beta_2\gamma_1$	1	1515	2124	1482	140
	2	215	384	218	179
	3	312	389	306	125
	4	110	229	119	208
	5	214	354	211	165
				Promedio	163
				Desviación st.	32.7
				Error st.	5.7
α_3 (H126R) $\beta_2\gamma_1$	1	178	470	169	264
	2	885	1351	870	153
	3	178	320	181	180
	4	498	939	475	189
	5	164	235	169	143
	6	459	725	461	158
	7	456	1014	451	222
	8	164	459	163	280
				Promedio	199
				Desviación st.	55
				Error st.	7

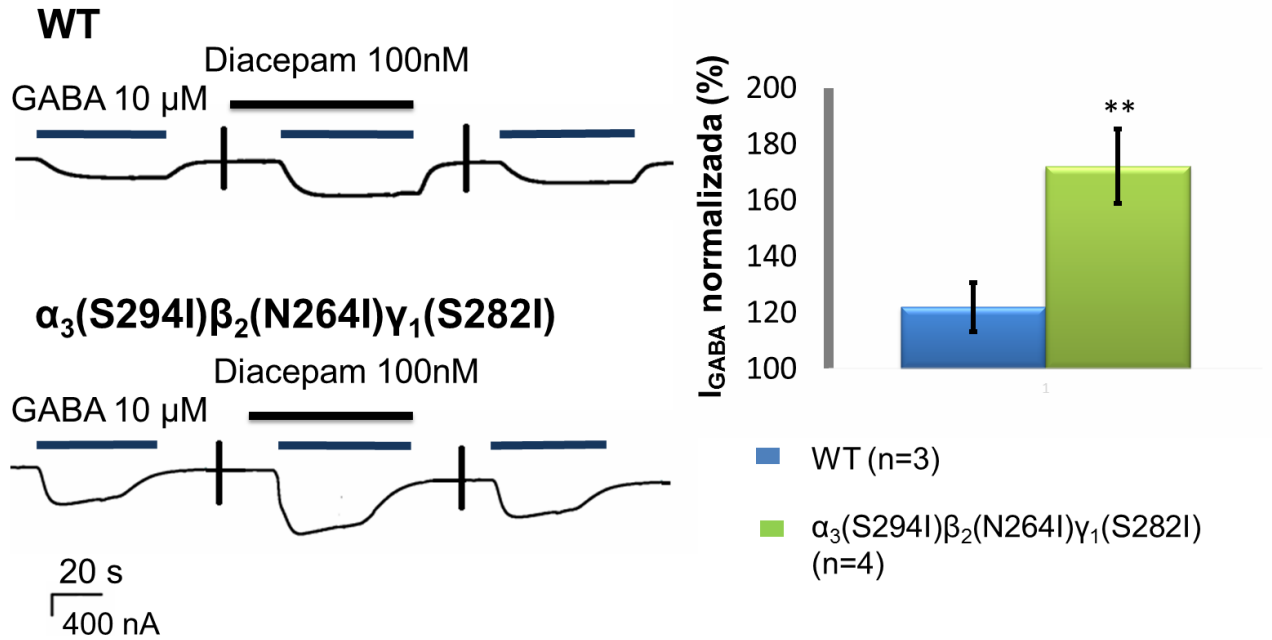
Figura 8. Efecto de la β -CCB sobre el receptor GABA_A mutante que elimina el sitio de alta

afinidad a BDZ. La diferencia entre la potenciación normalizada debida a β -CCB de un receptor silvestre (n=5, N=3) y el receptor mutante al sitio de alta afinidad (n=8, N=4) es estadísticamente significativa (t de 2 muestras independientes, p=0.049). En la tabla se encuentran los valores de intensidad de corriente de cada experimento.

Los resultados mostrados en la Figura 8, indican que receptor mutado α 3H126R tuvo un comportamiento significativamente diferente al del receptor silvestre, ya que mientras que la respuesta del receptor silvestre (n=5) fue potenciada alrededor del 60% por la β -CCB, en el receptor mutado en cambio, la β -carbolina provocó una potenciación aun mayor de la respuesta, siendo en promedio de $199 \pm 17.9\%$ (n=8). Este resultado indicó que el sitio de alta afinidad para BDZ no es el responsable de la potenciación observada en el receptor expresado heterológamente en ovocitos, y sugiere fuertemente que tampoco sería el del sitio observado en el receptor endógeno oligodendroglial (Arellano *et al.*, 2016; Ordaz, 2017).

Mutaciones del sitio de baja afinidad a BDZ

La siguiente serie de experimentos se realizó en receptores en los cuales fueron realizadas mutaciones puntuales localizadas en la región transmembranal, en cada una de las subunidades $\alpha_3\beta_2\gamma_1$, manipulación que se sabe elimina el sitio de baja afinidad a las BDZ clásicas (Walters *et al.*, 2000; Middendorp *et al.*, 2015).



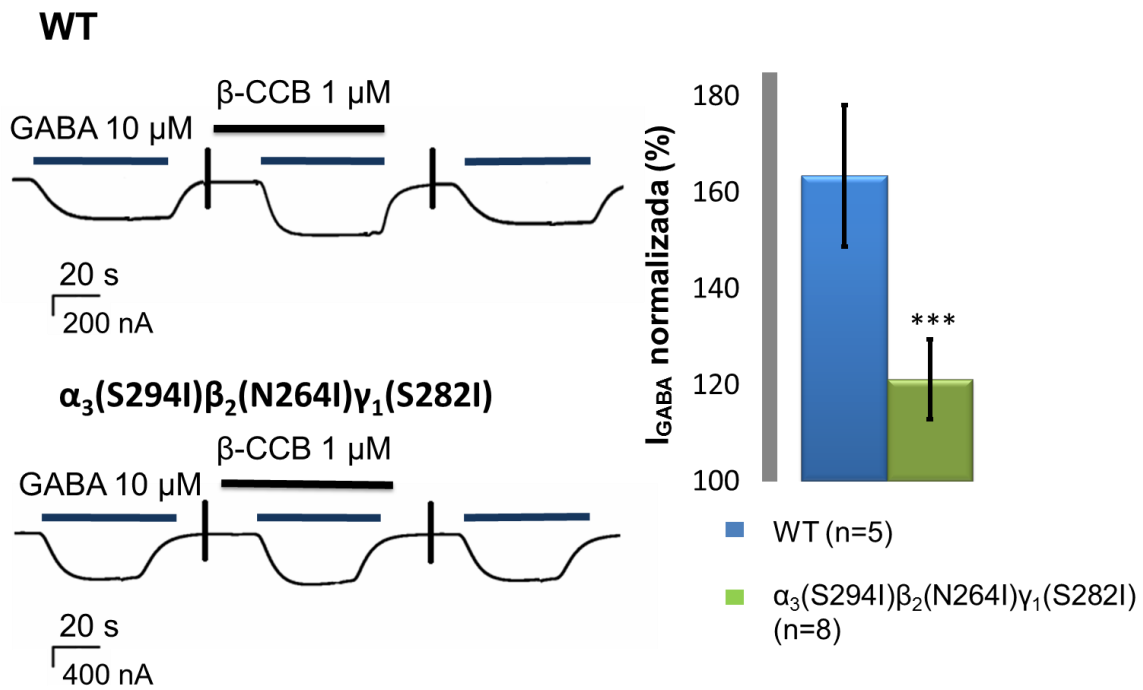
Receptor	Ovocito	GABA (nA)	GABA+Diazepam (nA)	GABA lavado (nA)	% de corriente normalizada
$\alpha_3\beta_2\gamma_1$	1	21	29	21	138
	2	216	260	215	120
	3	379	409	362	108
				Promedio	122
				Desviación st.	15.2
			Error st.	3.9	
α_3 (S294I) β_2 (N264I) γ_1 (S282I)	1	225	386	213	172
	2	30	44	29	147
	3	734	1213	724	165
	4	645	1339	640	208
				Promedio	173
			Desviación st.	25.5	
			Error st.	5.1	

Figura 9. Efecto de una benzodiazepina clásica en un receptor α_3 (S294I) β_2 (N264I) γ_1 (S281I). Se comparan los efectos de la potenciación de GABA en receptores que han sido mutados para la eliminación de sitios de unión a benzodiazepinas. El primer registro corresponde a un ovocito que ha expresado el receptor silvestre que es representado de color azul en la gráfica (n=3, N=3). Inmediatamente, se representa el efecto sobre un ovocito con la triple mutación en las subunidades $\alpha_3\beta_2\gamma_1$, de color verde en la gráfica (n=4, N=4). Se puede observar que este receptor tiene aún mayor efecto que el receptor silvestre con una diferencia significativa (prueba t de muestras independientes, p=0.034). Para hacer la comparación gráfica de los datos obtenidos se utilizaron valores de ovocitos que expresaron el receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ WT que ya han sido presentados en la figura 7. En la tabla se encuentran los valores de intensidad de corriente de cada experimento.

La primera pregunta realizada fue si los receptores mutados $\alpha_3(S294I)\beta_2(N264I)\gamma_1(S281I)$ aun presentaban el sitio de alta afinidad para diazepam en nuestro sistema de expresión, tal y como ha sido mostrado previamente (Walters *et al.*, 2000). Estos resultados fueron resumidos en la Figura 9 que muestran que la co-aplicación de diazepam (100 nM) fue capaz de potenciar el receptor mutado, activando la respuesta en una concentración de GABA 10 μ M. Aun y cuando se observó un aumento en la sensibilidad a GABA, la concentración utilizada de 10 μ M (0.52 ± 0.23 μ A; n=3, N=3), se encontró lejos del máximo de respuesta observado, activándola con GABA 100 μ M (5.048 ± 2.036 μ A; n=4, N=4), lo que indicó que la capacidad de potenciación es factible de ser observada a 10 μ M GABA. Tomando en cuenta este resultado, y para propósitos de comparación, es más adecuado mantener la misma concentración de los fármacos utilizados hasta ahora en los experimentos, éstas entonces fueron utilizadas también para el estudio de los efectos de β -CCB sobre la mutante $\alpha_3(S294I)\beta_2(N264I)\gamma_1(S281I)$. Los protocolos de co-aplicación fueron también similares a los experimentos realizados en la mutante del sitio de alta afinidad. En la figura 10 fueron resumidos los resultados correspondientes donde se pudo observar que el receptor $\alpha_3(S294I)\beta_2(N264I)\gamma_1(S281I)$ tuvo una diferencia muy importante comparado con el observado en el receptor nativo, en donde la co-aplicación de β -CCB y GABA (Figura 10) provocó una potenciación de $163 \pm 14.5\%$ (n=5), mientras que en el receptor mutado fue de $121 \pm 8.2\%$ (n=8); es decir, este receptor presentó bajo estas condiciones, una disminución significativa en la eficiencia de β -CCB como modulador positivo.

Es necesario también resaltar el hecho que GABA 10 μ M produjo una mayor respuesta en el receptor $\alpha_3(S294I)\beta_2(N264I)\gamma_1(S281I)$ comparado con el receptor nativo, lo que podría estar indicando que la triple mutación tuvo un efecto que, por ejemplo, afecta la eficiencia de expresión del receptor en la membrana, o inclusive aun sea indirectamente, podría afectar el sitio de unión a GABA. Como ha sido mencionado en los antecedentes, este sitio se encuentra en la interfase de las regiones transmembranales de las subunidades α y β , lo cual haría plausible la última posibilidad.

Aun cuando el receptor mutante $\alpha_3(S294I)\beta_2(N264I)\gamma_1(S282I)$ no fue estudiado con detalle aquí, es importante hacer notar que se comporta de manera similar a algunos otros reportados en la literatura (Walters *et al.*, 2000), principalmente en los parámetros relacionados con el aumento en la corriente máxima y una aparente mayor sensibilidad al GABA. La región de este sitio de unión a BDZ es muy importante, pues colinda con sitios de unión para diferentes fármacos, y su mutación podría afectar inclusive la apertura del canal. Esto podría ser parte de los mecanismos que alteran los parámetros funcionales mencionados.



Receptor	Ovocito	GABA (nA)	GABA+β-CCB (nA)	GABA lavado (nA)	% de corriente normalizada	
$\alpha_3\beta_2\gamma_1$	1	1515	2124	1482	140	
	2	215	384	218	179	
	3	312	389	306	125	
	4	110	229	119	208	
	5	214	354	211	165	
				Promedio	163	
				Desviación st.	32.7	
				Error st.	5.7	
	$\alpha_3(S294I)\beta_2(N264I)\gamma_1(S282I)$	1	69	94	72	136
		2	259	299	248	115
3		124	135	126	109	
4		110	130	108	118	
5		90	83	86	92	
6		4649	6794	4586	146	
7		2793	4385	2842	157	
8		4494	4277	4436	95	
				Promedio	121	
				Desviación st.	29.3	
			Error st.	5.4		

Figura 10. Efectos de la mutación en las 3 subunidades del receptor GABA_A $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ que eliminan el sitio de baja afinidad a diazepam. En el gráfico se puede observar el efecto modulador de la β -CCB en el receptor silvestre (n=5, N=3) y el receptor mutante (n=8, N=5). Se puede observar que hay una importante disminución en la potenciación al añadir β -CCB al medio (p=0.019, prueba t para 2 muestras). Para hacer la comparación gráfica de los datos obtenidos se utilizaron valores de ovocitos que expresaron el receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ WT que ya han sido presentados en la figura 8. En la tabla se encuentran los valores de intensidad de corriente de cada experimento.

Finalmente, aún y cuándo esta mutación provocó una importante disminución en la potenciación producida por β -CCB, su eliminación tampoco fue suficiente para abatir por completo el efecto, por lo que decidimos realizar experimentos expresando receptores donde fueron eliminados los 2 sitios de unión a benzodiazepinas involucrados y explorar si pudieran existir efectos sinérgicos entre los dos sitios.

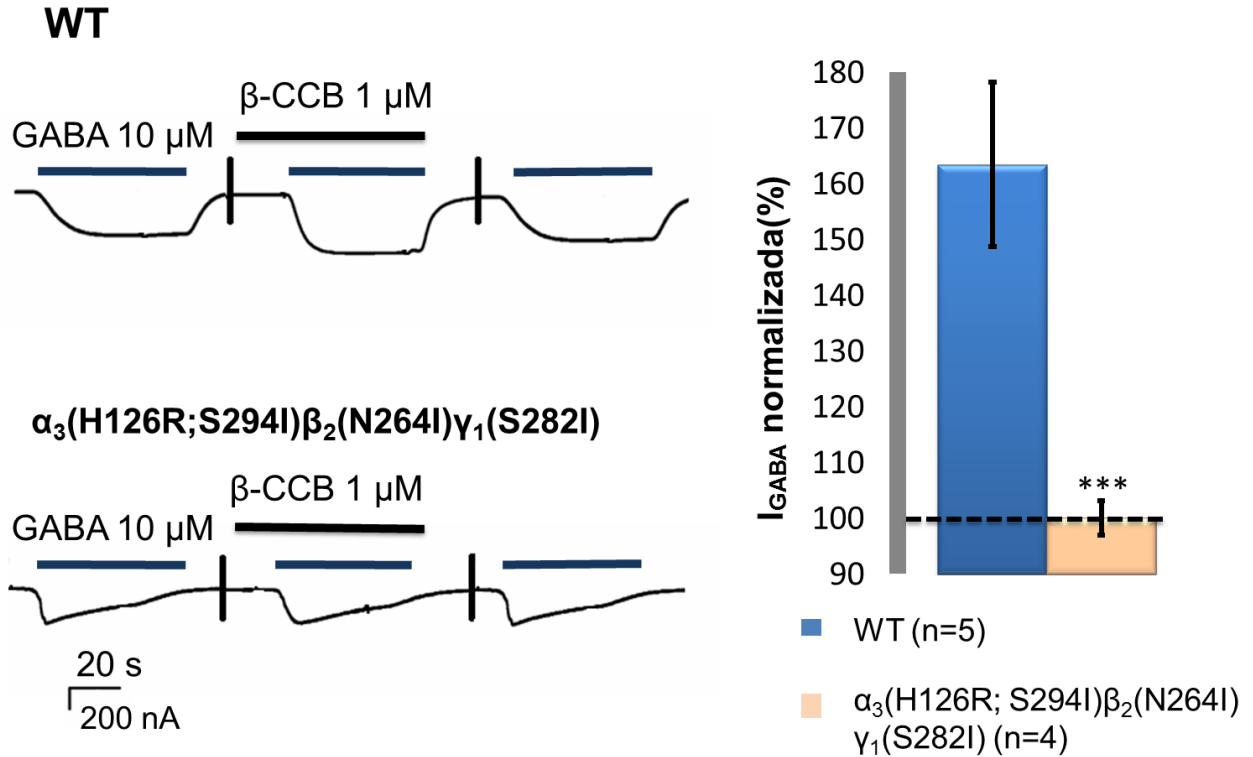
Eliminación de los sitios de alta y baja afinidad a BDZ en el receptor oligodendroglial.

Nuestros resultados descritos hasta ahora mostraron que el eliminar, por separado, los sitios de alta y baja afinidad para benzodiazepinas, no fue suficiente para eliminar el efecto potenciador de β -CCB. Es por esto que fueron expresados y analizados receptores que contenían las mutaciones para los dos sitios de unión a BDZ; el razonamiento para el

análisis de este receptor es la posibilidad de que la acción de β -CCB sobre uno u otro de los sitios no fueran independientes, y la unión de la droga a uno de ellos afectará al segundo sitio. Como ha sido mencionado anteriormente, el sitio de alta afinidad a BDZ se encuentra en la interfase de los dominios extracelulares de las subunidades α y γ , mientras que, el sitio de baja afinidad a BDZ se encuentra en la interfase entre los segundos dominios transmembranales de las subunidades α y β . Es decir, entre las mutaciones que se realizaron en la subunidad $\alpha 3$ hay una distancia de 168 aminoácidos, por lo que, es poco probable un efecto directo de una mutación sobre la otra. Sin embargo, un efecto alostérico que afecte estas acciones aún es posible.

Para estos experimentos, se sintetizó cRNA que contenía las mutaciones necesarias y se introdujo en el ovocito para su expresión, en este caso la subunidad $\alpha 3$ fue mutada para contener los cambios H126R y S294I simultáneamente, mientras que las subunidades β y γ utilizadas fueron las que se utilizaron para el receptor mutante al sitio de baja afinidad. Al igual que en los casos anteriores, se utilizaron las condiciones de una concentración de GABA de 10 μ M y una concentración del β -CCB de 1 μ M. Es importante hacer notar que la corriente generada por GABA en este receptor mutante tuvo un valor numérico en promedio de 207 ± 70 nA, no obstante, la desensibilización de este receptor fue acelerada de manera significativa (Figura 11) en la presencia del agonista, y contrasta con la ausencia de este efecto en el receptor nativo.

En conclusión, aparentemente la sensibilidad a β -CCB y su efecto potenciador podría requerir de la unión del modulador a ambos sitios; sin embargo, los resultados sugieren que la mayor parte del efecto depende del sitio de baja afinidad a BDZ.



Receptor	Ovocito	GABA (nA)	GABA+ β -CCB (nA)	GABA lavado (nA)	% de corriente normalizada
$\alpha_3\beta_2\gamma_1$	1	1515	2124	1482	140
	2	215	384	218	179
	3	312	389	306	125
	4	110	229	119	208
	5	214	354	211	165
				Promedio	163
				Desviación st.	32.7
				Error st.	5.7
$\alpha_3(\text{H126R};\text{S294I})\beta_2(\text{N264I})\gamma_1(\text{S282I})$	1	330	325	328	98
	2	175	189	173	108
	3	210	195	200	93
	4	129	130	129	101
				Promedio	100
				Desviación st.	6.3
				Error st.	2.5

Figura 11. Comparación entre el receptor silvestre y el mutante $\alpha_3(\text{H126R};\text{S294I})\beta_2(\text{N264I})\gamma_1(\text{S282I})$. El gráfico muestra la corriente normalizada a GABA en presencia de β -CCB, con respecto a la respuesta observada a GABA en ausencia de la droga, tanto para los receptores silvestres (n=5, N=3) como para el receptor mutado (n=4, N=2). La diferencia en el nivel de potenciación fue estadísticamente diferente ($p=0.016$, prueba t para 2 muestras). La información obtenida para este receptor con 4 mutaciones fue comparada con un pool general de valores obtenidos del receptor silvestre en experimentos anteriores. En la tabla se encuentran los valores de intensidad de corriente de cada experimento.

Discusión

El receptor GABA_A conformado por las subunidades $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ ha sido estudiado ampliamente en nuestro laboratorio, y las evidencias encontradas hasta ahora, indican que este es el receptor de mayor expresión en oligodendrocitos del nervio óptico de rata. En el presente estudio, hemos hecho modificaciones moleculares a este receptor, y hemos observado las consecuencias funcionales de estas modificaciones sobre la acción potenciadora de la β -carbolina endógena llamada β -CCB. Es decir, los experimentos de mutación dirigida realizados en este trabajo, permiten disecar los posibles sitios de unión para la β -CCB sobre el receptor mencionado.

Primero, realizamos una mutación (α_3 H126R) para eliminar el sitio de alta afinidad a benzodiazepinas. Este sitio tiene su nombre debido a que la respuesta del receptor GABA_A se ve potenciada en presencia de GABA, cuando existe además una concentración nanomolar de una benzodiazepina clásica como el diazepam. Es importante hacer la observación de que este sitio modulador, se encuentra localizado en la región extracelular de la proteína, de manera que está expuesto de manera directa al medio. Esto sugiere que las propiedades de hidrofílicas y lipofílicas de estas drogas, podría jugar un papel importante en sus efectos sobre el receptor GABA_A. La familia de las β -carbolinas es un grupo de alcaloides que por lo general son muy poco solubles en agua y que para su uso experimental tienen que ser disueltos en una mezcla de agua con dimetil sulfóxido (DMSO). Entre la información que exhiben algunos proveedores de estas sustancias se indica que esta familia de sustancias es insoluble en agua, pero son solubles en DMSO y etanol, en particular la β -CCB tiene una solubilidad de 26.83 mg/ml y 1.34 mg/ml en DMSO y etanol, respectivamente. Por otro lado, las benzodiazepinas, tienen una solubilidad en medios acuosos variable, de manera que, nuestra benzodiazepina en este trabajo, diazepam, tiene una solubilidad en agua de 0.05 mg/ml. Es posible entonces, que las β -carbolinas de mayor naturaleza hidrofílica (por ejemplo, la β -carbolina DMCM presenta una solubilidad en agua de 0.35 mg/ml) interactúen más con el sitio de alta afinidad, el cual tiene propiedades que le permiten a los fármacos actuar como un agonista inverso en neuronas, tal y como fueron descritos de manera original (Weiss *et al.*, 1995).

En este trabajo se utilizó una concentración 1 μM de $\beta\text{-CCB}$ para monitorear su efecto sobre los receptores expresados heterológamente en ovocitos de *Xenopus*. En la figura 8 se puede observar que la eliminación del sitio de alta afinidad para BDZ provocó una mayor potenciación del $\beta\text{-CCB}$ (comparado con lo observado en el receptor nativo o silvestre). Este efecto fue semejante al observado por Ordáz (2017), en donde el receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ fue expresado heterológamente y estudiado el efecto de la droga flumazenil sobre la acción de la $\beta\text{-CCB}$ y del diazepam. El flumazenil es un potente antagonista competitivo del sitio de unión de alta afinidad de las benzodiazepinas, y actúa bloqueando el sitio de unión a benzodiazepinas que se encuentra en el dominio extracelular (Votey *et al.*, 1991). La acción de flumazenil sobre el receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ indicó que bloquea por completo el efecto modulador de diazepam, pero en claro contraste, el flumazenil aumenta aún más el efecto potenciador de la $\beta\text{-CCB}$ sobre el receptor. Como mostramos aquí, la eliminación del sitio de unión a través de la mutación H126R tuvo el mismo efecto que se observa cuando se bloquea farmacológicamente el sitio. Estos hallazgos indican que el efecto potenciador de $\beta\text{-CCB}$ no corresponde al sitio de alta afinidad para BDZ, sin embargo, la unión a este sitio parece provocar un efecto inhibitorio actuando sobre este sitio. Este último efecto corresponde, por sus características, con el que se ha descrito en general, como la acción de agonista inverso de diversas β -carbolinas en los receptores neuronales. Esto sugiere que en el receptor oligodendroglial la $\beta\text{-CCB}$ podría unirse a los dos sitios, y de esta manera presentar los dos efectos de manera simultánea, uno inhibitorio sobre el sitio de alta afinidad para BDZ, y otro potenciador sobre un sitio diferente. En el receptor nativo la acción potenciadora del $\beta\text{-CCB}$ es de mayor amplitud que la inhibitoria, por lo que la resultante en su acción es de un modulador positivo sobre la respuesta del receptor. Concluimos de esto que la eliminación efectiva del sitio de alta afinidad eliminó el sitio inhibitorio, por lo que se expresa principalmente el efecto potenciador de la droga.

Por otro lado, el sitio de baja afinidad para diazepam requiere de concentraciones del orden micromolar para producir su efecto sobre el receptor GABA_A neuronal, sin embargo, no se cuenta actualmente con antagonistas específicos para este sitio por lo que se ignora si sustancias como las β -carbolinas pudieran unirse a este sitio con mayor afinidad. Lo que es claro es que la aplicación de $\beta\text{-CCB}$ a una concentración de 1 μM tuvo un efecto

potenciador significativo. En la Figura 10 se puede observar que a diferencia del receptor silvestre, el receptor mutante $\alpha_3(S294I)\beta_2(N264I)\gamma_1(S281I)$ tuvo una mucho menor sensibilidad a la β -CCB y el efecto potenciador de la droga disminuyó de manera significativa. Sin embargo, aunque este efecto disminuyó de manera importante, éste no fue eliminado, lo cual sugiere que dentro del receptor se encuentra un tercer sitio de unión para la β -CCB, o alternativamente, podría significar que existe algún tipo de interacción entre ambos sitios de unión conocidos para las BDZ. Este hipotético tercer sitio para la β -CCB, probablemente se trate del postulado sitio de unión a BDZ que se encuentra en los sitios homólogos al sitio de unión a GABA ($\beta^+\alpha^-$), ubicados en la interfase de los dominios extracelulares de las subunidades $\alpha^+\beta^-$ (Middendorp *et al.*, 2015). Sin embargo, por el momento no es posible confirmar esta hipótesis, ya que aún no ha sido posible encontrar una mutación que permita, como en este trabajo, eliminar este sitio para observar sus efectos.

Una vez que obtuvimos información de cada uno de los sitios por separado expresamos el receptor $\alpha_3(H126R; S294I)\beta_2(N264I)\gamma_1(S281I)$ que tuvo mutaciones para eliminar los 2 sitios simultáneamente. Los resultados fueron resumidos en la Figura 11 y mostraron que este receptor fue completamente insensible a la β -CCB. La conclusión directa de este resultado sería que el efecto requiere de los dos sitios de unión estudiados, sin embargo, es muy importante notar que las mutaciones realizadas modificaron de manera sustancial el comportamiento del receptor, cambiando la sensibilidad a GABA así como la cinética de la corriente, aumentando la desensibilización del mismo a la concentración de GABA aplicada. Aún no existe reporte de las características de este receptor por lo que la conclusión planteada debe ser tomada con cautela. Analizando modelos *in silico* (Biasini *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014) de este receptor se puede notar, que las mutaciones que se hacen para eliminar el sitio de baja afinidad se encuentran en el segundo dominio transmembranal, un dominio que es blanco de otros fármacos como propofol, etomidato, etc. (Sieghart, 2014; Benkert *et al.*, 2011) y forma parte del canal iónico. Es posible entonces que la suma de las mutaciones en el receptor $\alpha_3(H126R; S294I)\beta_2(N264I)\gamma_1(S281I)$ al afectar los mecanismos de desensibilización afecten de manera indirecta la esperada potenciación por β -CCB. Este receptor en el que han sido eliminados los dos sitios debe ser analizado en presencia de otros fármacos que tengan sitios de unión en regiones cercanas a los sitios de

unión a benzodiazepinas, de manera que podamos inferir si este efecto de insensibilidad es debido a la eliminación de los sitios, o en cambio que las mutaciones hayan provocado un cambio profundo en la estructura del receptor y por lo tanto excluyéndolo para usarlo para hacer inferencias sobre la actividad normal del receptor silvestre.

Las bases moleculares que permiten modificar la actividad farmacológica en un receptor nos han permitido observar los efectos que tiene la β -CCB en el receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$. Por lo tanto un siguiente paso interesante, sería la comparación de estos efectos en el receptor neuronal, lo cual permitiría discernir las posibles diferencias que existen entre estos dos tipos de receptores.

Conclusiones

- 1) El receptor $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ presenta al menos dos sitios de unión para las β -carbolinas. Estos sitios coinciden con los sitios de unión a BDZ, y al modificarlos molecularmente podemos eliminar selectivamente la acción de diacepam lo que permite explorar las consecuencias funcionales por parte de la β -CCB.
- 2) El sitio de alta afinidad a BDZ, al ser ocupado por β -CCB, tiene un efecto modulador inhibitorio sobre el receptor oligodendroglial. Este efecto alostérico se evidenció al eliminar el sitio en la mutante α_3 H126R.
- 3) El sitio de baja afinidad a BDZ es un sitio de modulación positiva para β -CCB en el receptor oligodendroglial. Este efecto alostérico se evidenció al eliminar el sitio en la mutante α_3 (S294I) β_2 (N264I) γ_1 (S281I).
- 4) Existe un remanente de la potenciación de receptor α_3 (S294I) β_2 (N264I) γ_1 (S281I) en respuesta a GABA con β -CCB. Este remanente es eliminado al introducir mutaciones que bloquean ambos sitios como lo hace la mutante α_3 (H126R;S294I) β_2 (N264I) γ_1 (S281I).

Referencias

Arellano R O y Miledi R; Novel Cl⁻ currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *The Journal of General Physiology* 102 (102): 833-857. 1993.

Arellano R O, Woodward R M y Miledi R; A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology* 484(3): 593-604. 1995.

Arellano R O, Sanchez-Gomez M V, Alberdi E, Canedo M, Palomino A, -Samartin A, y Matute C; Neuron and glia interaction regulates GABA_A receptor expression in the oligodendrocyte membrane. *Glía* 63: 202-203. 2015.

Arellano R O, Sánchez-Gómez M V, Canedo-Antelo, Alberdi E, Chara M J C, Palomino A, Pérez-Samartín A, y Matute C; Axon-to-Glia Interaction Regulates GABA_A Receptor Expression in Oligodendrocytes. *Molecular Pharmacology* 89: 63–74. 2016.

Baur R, Tan K R, Lüscher B P, Gonthier A, Goeldner M y Erwin S; Covalent modification of GABA_A receptor isoforms by a diazepam analogue provides evidence for a novel benzodiazepine binding site that prevents modulation by these drugs. *Journal of Neurochemistry* 106 (6):2353-2363. 2008.

Benkert P, Biasini M, y Schwede T; Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27: 343-350. 2011.

Benson J A, Löw K, Keist R, y Mohler H, Rudolph U; Pharmacology of recombinant γ -aminobutyric acid receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated subunits. *FEBS Letters* 431: 400-404. 1998.

Bergmann R, Kongsbak K, Sørensen P L, Sander T, y Balle T; A Unified Model of the GABA_A Receptor Comprising Agonist and Benzodiazepine Binding Sites. *PLoS ONE* 8(1). e52323. 2013.

Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Tudler G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino T G, Bertoni M, Bordoli L, y Schwede T; SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research* 42: 252-258. 2014.

Bradl M y Lassmann H; Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathology* 119: 37–53. 2010.

Brandon C y Fisher J; Identification of structures within GABA_A receptor α subunits that regulate the agonist action of pentobarbital. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic* 318: 1094-101. 2006

Callaway J C; Pinoline and other Tryptamine derivates: Formation and function. *Kuopio University Publications A. Pharmaceutical Sciences* 15: 30. 1994.

Chan Oh W, Lutz S, Castillo P, y Kwon H; De novo synaptogenesis induced by GABA in the developing mouse cortex. *Science* 353: 1037-1040. 2016.

Crestani J, Gyntber J, Posso A, Airaksinen M, y Vepsäläinen J; The Pictet-Spengler reaction and biogenic tryptamines: Formation of tetrahydro- β -carbolines at physiological pH. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 31(2): 38-49. 1994.

Crestani F, y Rudolph U; Behavioral Functions of GABA_A Receptor Subtypes - The Zurich Experience. *Advances in Pharmacology* 72: 38-49. 2014.

Dong X, Stothard P, Forsythe I J, y Wishart E S; PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Research* 32: 660-661. 2004

Duncalfe L, Carpenter M R, Smillie L B, Martin I L, y Dunn S M J; The Major Site of Photoaffinity Labeling of the γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor by [³H]Flunitrazepam Is Histidine 102 of the α Subunit. *Journal of Biological Chemistry* 271 (16): 9209-9214. 1996.

Frühbeis¹ C, Fröhlich D, Kuo W P, y Krämer-Albers E; Extracellular vesicles as mediators of neuron-glía communication. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13: 1-6. 2013.

Frühbeis² C, Fröhlich D, Kuo, W P, Amphornrat J T M, y Saab A S; Neurotransmitter-triggered transferosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLOS Biology*. 11e1001604. 2013.

Hamilton N B, Clarke L, Arancibia-Carcamo L, Kougioumtzidou E, Matthey M, Káradóttir R, Whiteley L, Bergersen L, Richardson W, y Attwell D; Endogenous GABA Controls Oligodendrocyte Lineage Cell Number, Myelination, and CNS Internode Length. *Glia* 65: 309–321. 2017.

Gundersen V, Storm-Mathisen J, y Hildegard B L; Neuroglial transmission. *Physiology Reviews* 95: 695–726. 2015.

Herraiz T, y Galisteo J; Naturally-occurring tetrahydro-b-carboline alkaloids derived from tryptophan are oxidized to bioactive b-carboline alkaloids by heme- peroxidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 451: 42–47. 2014.

Jeziorski M C, Greenberg R M, Clark K S, y Anderson P A; Cloning and functional expression of a voltage-gated calcium channel $\alpha 1$ subunit from jellyfish. *Journal of Biological Chemistry*. 273 (35): 22792-22799. 1998

Laviță S I, Aro R, Kiss B, Manto M, y Duez P; The Role of β -Carboline Alkaloids in the Pathogenesis of Essential Tremor. *Cerebellum* 15: 276–284. 2016.

Medina J H, Levi de Stein M, y De Robertis E; n-[³H]Butyl-P-Carboline-3- Carboxylate, Putative Endogenous Ligand, Binds Preferentially to Subtype 1 of Central Benzodiazepine Receptors. *Journal of Neurochemistry* 52 (3): 665-670. 1989.

Michalski J P y Kothary R; Oligodendrocytes in a Nutshell. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 19: 1 - 11 . 2015.

Middendorp S J, Maldifassi M C, Baur R, y Sigel E; Positive modulation of synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors by an antagonist of the high affinity benzodiazepine binding site. *Neuropharmacology* 95: 459-467. 2015.

Miledi R y Woodward M; Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology* 416: 601-621. 1989.

Motlagh H, Wabrl J O, Li J, y Hilser V J; The ensemble nature of allostery. *Nature* 508: 331-339. 2014.

Olsen R W y Sieghart W; International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacology Reviews* 60: 243–260. 2008.

Olsen R W y Sieghart W; GABA_A receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56 (2009): 141–148. 2015

Ordaz P; Caracterización farmacológica de subunidades GABA_A provenientes de oligodendrocitos del nervio óptico de la rata (*Rattus norvegicus*). UNAM. 2017.

Ordáz P, Martínez-Robles L, Garay E, Sánchez-Gómez M V, Pérez- Samartín A, Matute C y Arellano R O; The putative GABA_A receptor expressed in oligodendrocytes and the mechanism of its potentiation by β -carbolines. En preparación. 2019.

Paez P M, Fulton D J, Spreuer V, Handley V, Campagnoni C W, Macklin W B, Colwell C, y Campagnoni A T; Golli myelin basic proteins regulate oligodendroglial progenitor cell migration through voltage-gated Ca⁺⁺ influx. *Journal of Neuroscience* 29(20): 6663–6676. 2009.

Peña C, Medina J H, Novas M L, Paladini A C, y De Robertis E; Isolation and identification in bovine cerebral cortex of n-butyl b-carboline-3-carboxylate, a potent benzodiazepine binding inhibitor. *Proceedings of National Academy Science USA* 83: 4952–4956. 1986.

Rommelspacher H, Kauffmann H, y Cohnitz CH; Pharmacological properties of Tetrahidronorharmane. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 298: 83-91 1977

Schofield P R, Darlison M G, Fujita N, Burt D R, Stephenson F A, y Rodriguez H; Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*, 328(6127), 221–227. 1987.

Sieghart W. Allosteric Modulation of GABA_A Receptors. *Advances in Pharmacology*, 72: 55-83. 2014.

Simons M y Nave K. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 8(1): 1-15. 2016.

Tomassy S G, Berger D R, Chen H, Kasthuri N, Hayworth K, Vercelli A, Seung S, Lichtman J W, y Arlotta P; Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science* 319 (6181): 319-324. 2014.

Vélez-Fort M, Audinat E, y Angulo M C. Central role of GABA in neuron-glia interactions. *Neuroscientist* 18(3):237-50. 2012

Votey S R, Bosse G M, Bayer M J, y Hoffman J R; Flumazenil: A new benzodiazepine antagonist. *Annals of Emergency Medicine* 20:181-188. 1991

Walters R J, Hadley S H, Morris K D W, y Amin J; Benzodiazepines act on GABA_A receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nature Neuroscience* 12: 1274-1281. 2000.

Weiss M, Buldakova S, y Dutova E; Interaction of the/3-carboline harmaline with a GABA-benzodiazepine mechanism: an electrophysiological investigation on rat hippocampal slices. *Brain Research* 695: 105-109.1995.

Yoon B y Lee C J; GABA as a rising gliotransmitter. *Frontiers on Neural Circuits*. 8: 1-11. 2014.

Zhang Y, Chen K, Sloan S A, Bennett M L, Scholze A R, O'Keefe S, Phatnani H P, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow S A, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres B A, y Wu X Q; An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *The Journal of Neuroscience*. 34(36): 11929 –11947. 2014.

Zonouzi M, Scafidi J, Li P, McEllin B, Edwards J, Dupree J L., Harvey L, Sun D, Hübner C A, Cull-Candy S G, Farrant M, y Gallo V; GABAergic regulation of cerebellar NG2-cell development is altered in perinatal white matter injury. *Nature Neuroscience* 18(5): 674–682. 2015.