

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata

NUCLEO DISCIPLINARIO: Química

Título del trabajo: **APLICACIÓN DE LA BIOINFORMÁTICA EN QUÍMICA MEDICINAL: LA BÚSQUEDA DE NUEVOS MODULADORES DEL RECEPTOR GABA-A.**

AUTOR(es): Ailín Leticia Buzzi, Alan Talevi, Andrea Enrique, Luis E. Bruno-Blanch

NIVEL DE FORMACIÓN DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL: Estudiante (no graduado)

ORIENTADOR: Luis Enrique Bruno-Blanch

CORREOS ELECTRÓNICOS DE LOS AUTORES: ailinleti@gmail.com, atalevi@biol.unlp.edu.ar, avedos@gmail.com, lbb@biol.unlp.edu.ar

PALABRAS CLAVES: bioinformática – receptor GABA_A - epilepsia

PALAVRAS CHAVES: bioinformática – receptor GABA_A - epilepsia

RESUMEN:

Introducción.

La epilepsia es el principal desorden crónico del sistema nervioso central, afectando a unas 50 millones de personas en el mundo. Uno de los principales mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos es la potenciación de la vía GABAérgica, por prolongación del tiempo de acción del neurotransmisor endógeno GABA o por administración de análogos sintéticos del GABA o fármacos que actúan a nivel de sitios alostéricos del receptor. En el presente trabajo se emprendió la búsqueda racional de moduladores de la vía GABAérgica mediante utilización de herramientas bioinformáticas.

Metodología.

Se utilizaron BLASTp e InterProScan para buscar proteínas con estructura primaria, secundaria y terciaria similares a las de las subunidades del receptor GABA_A. Identificado un receptor homólogo al GABA_A, se estudió la conservación de aquellos aminoácidos involucrados en unión a fármacos. Se analizó el conjunto de ligandos conocidos del receptor homólogo en busca de potenciales nuevos moduladores de GABA_A. Uno de ellos fue ensayado en un modelo animal agudo de convulsión (ensayo scPTZ en ratones).

Resultados.

Se encontró una gran similitud estructural entre GABA_A y GlyR. Muchos de los aminoácidos de GABA_A implicados en unión a fármacos se encuentran conservados o sustituidos conservativamente en GlyR. La revisión bibliográfica indicó que 33 ligandos de GlyR han sido ensayados frente al scPTZ test demostrando actividad anticonvulsiva. Se evaluó el acamprosato de sodio, un ligando de GlyR, en el ensayo scPTZ, demostrando su acción proconvulsivante.

Conclusiones.

La aplicación de herramientas de la bioinformática permitió identificar un nuevo modulador negativo de la vía GABAérgica, según surge de los resultados en el ensayo scPTZ.

INTRODUCCIÓN:

Desde la determinación del Genoma Humano en 2003, la capacidad de secuenciación del ADN se ha incrementado exponencialmente gracias al advenimiento de las llamadas Tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación [1-4]. Desde aquel entonces, la secuenciación se ha vuelto unas 200 veces más eficiente y más barata que el tradicional método de Sanger [1], y se estima que en un futuro cercano la secuenciación del genoma de una persona rondará los US\$1000 [2,3]. El conocimiento del genoma y de sus productos génicos (proteínas) implica grandes posibilidades desde el punto de vista del diseño de fármacos (proveyendo potenciales nuevas dianas moleculares); por otro lado, la eficiencia y bajo costo de las tecnologías de secuenciación actualmente disponibles nos colocan a las puertas de la medicina personalizada (es decir, utilizar información genética de un paciente para la evaluación de riesgos, diagnóstico y selección del mejor tratamiento disponible – tratamiento personalizado en función del genoma del paciente) [4]. Sin embargo, una vez obtenida la secuencia del genoma restan todavía su análisis e interpretación: determinar qué proteínas son codificadas por los distintos genes, qué función desempeñan y las posibles implicancias clínicas de una variación en las mismas. La Bioinformática involucra un conjunto de herramientas computacionales destinadas a analizar, de manera eficiente gran cantidad de información de secuencias genéticas y proteicas. Dos de los principales usos de estas herramientas son la predicción de la función de un producto génico y la predicción de la importancia de una variación determinada en un producto génico [5,6]. La hipótesis subyacente de la comparación de secuencias de genes y proteínas es que dos proteínas con estructura similar tendrán función similar [5]. En este trabajo utilizamos las herramientas de la bioinformática para la búsqueda de potenciales nuevos fármacos partiendo de una segunda hipótesis que amplía la anterior: dos proteínas con alta similitud estructural tendrán una alta probabilidad de interactuar con ligandos en común. En otras palabras, consideramos que habrá una alta probabilidad de que un fármaco que actúa a nivel de una proteína determinada interactúe con otra proteína de estructura primaria y/o terciaria similar, en particular si los residuos implicados en el o los sitios activos son altamente conservados. Nos hemos enfocado en la búsqueda de ligandos de uno de los receptores asociados a la epilepsia: el receptor GABA_A.

La epilepsia es el desorden crónico más frecuente del sistema nervioso central (SNC), afectando a alrededor de 50 millones de personas en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 90% de los pacientes provienen de países en vías de desarrollo [7]. Los fármacos antiepilépticos disponibles actualmente poseen dos grandes limitaciones:

a) La alta frecuencia de reacciones adversas a la farmacoterapia antiepiléptica (sedación, náuseas, vómitos, alergia, discrasias sanguíneas, hepatotoxicidad, entre otras) [8].

b) La falta de respuesta adecuada (control de la sintomatología) a la farmacoterapia actual por parte de un 30 – 40% de la población epiléptica (epilepsia intratable o refractaria) [9-10].

Los inconvenientes asociados a la farmacoterapia disponible en la actualidad, explican la necesidad de desarrollar nuevos fármacos con toxicidad reducida, capaces de controlar la sintomatología de pacientes farmacorresistentes.

Dentro de los principales mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos encontramos la potenciación de la vía GABAérgica a nivel del sistema nervioso central (ya sea por prolongación del tiempo de acción del neurotransmisor endógeno GABA a nivel de la sinapsis neuronal o por administración de análogos sintéticos del GABA o fármacos que actúan a nivel de sitios alostéricos del receptor GABA_A, modulando la acción del GABA) [11]. Diferentes isoformas del receptor GABA_A han sido identificadas en mamíferos y humanos, correspondientes a distintas combinaciones pentaméricas de 19 subunidades conocidas. Cada subunidad es codificada por un gen distinto; clústers de genes codificantes de subunidades del receptor GABA_A han sido localizados en distintos cromosomas humanos [11-12].

En este trabajo hemos utilizado herramientas bioinformáticas para la búsqueda de compuestos químicos que actúen a nivel de la vía GABAérgica, análogos del GABA o moduladores alostéricos de la unión del GABA. Se buscaron proteínas con secuencias y dominios similares a los del receptor GABA_A en bases de datos de genes y proteínas hipotetizando que si dos proteínas poseen un alto porcentaje de similitud de secuencia proteica en la región de los sitios activos (en nuestro caso los sitios de unión del neurotransmisor GABA y sus moduladores alostéricos) los ligandos que interactúan con una de ellas podrían ser compuestos farmacológicos potencialmente activos en la otra.

OBJETIVOS

Identificación con el uso de herramientas bioinformáticas de nuevos agentes anticonvulsivos que actúen por potenciación de la vía GABAérgica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda de proteínas similares a las subunidades del receptor GABA_A

Inicialmente se procedió a la búsqueda de secuencias de las subunidades del receptor GABA_A, que posteriormente fueron utilizadas en la búsqueda de secuencias similares consignadas en bases de datos de proteínas y ácidos nucleicos. Las secuencias fueron obtenidas de SwissProt (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://ca.expasy.org/>), base de datos que incluye secuencias de proteínas curadas manualmente y con un alto nivel de anotación (incluye información sobre modificaciones post-traduccionales, ubicación subcelular, estructura en 3D si fuese conocida, funciones conocidas) [13]. Dichas secuencias fueron almacenadas en formato FASTA, un formato informático que sirve para representar las secuencias en forma de texto. Las secuencias del receptor humano GABA_A están depositadas en Swissprot bajo los siguiente códigos de identificación: subunidad α_1 P14867, subunidad β_2 P47870, subunidad γ_2 P18507.

Con el objetivo de identificar proteínas similares, se procedió a utilizar la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a través de la interfase web del National Center of Biotechnology Information del Instituto de Salud de Estados Unidos (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). BLAST es un sistema heurístico de búsqueda de similaridad de secuencias. El programa compara la secuencia (estructura primaria) de interés (secuencia query, en nuestro caso, la secuencia de cada una de las subunidades del receptor GABA_A humano) contra una base de datos de proteínas, con el fin de encontrar regiones de alineamiento local, y reportar esos alineamientos dándoles un puntaje o score según un umbral determinado por la matriz de sustitución utilizada. Es decir, se buscan regiones entre las dos proteínas comparadas que sean parecidas, aunque dichas zonas se hallen rodeadas por elementos completamente diferentes. El score (S, valoración que se le asigna a un alineamiento según la matriz de sustitución utilizada) da una información estadística de la significancia biológica del alineamiento [14]. Se utilizó como base de datos para la búsqueda la Non-redundant Protein Sequences del NCBI.

Con la idea de identificar la familia de proteínas a la que pertenece el receptor GABA_A y así acotar el grupo de proteínas similares cuyos ligandos podrían ser farmacológicamente activos en el sitio de unión del receptor GABA_A se ejecutó el programa InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) de la interfase EMBL-EBI. InterPro es una base de datos que integra modelos predictivos para encontrar similitudes entre las estructuras secundaria y terciaria de la proteína de interés y las de otras proteínas depositadas en múltiples bases de datos: Gene3D, PANTHER, Pfam, PRSF, PRINTS, ProDom, PROSITE, SMART, SUPERFAMILY y TIGRFAMs [15]. Cuando el programa

encuentra coincidencias entre la secuencia query y diferentes elementos de las bases de datos, se presume que pertenecen a la misma familia de proteínas o que, por lo menos, poseen ciertos dominios en común¹.

A partir de los resultados de búsqueda utilizando BLAST e InterProScan se estableció un vínculo relevante entre el receptor humano GABA_A y el receptor de Glicina (GlyR), dado que pertenecen a la misma familia de proteínas: la familia de receptores cys-loop (pertenecientes a la superfamilia de receptores iónicos activados por ligando) en la que encontramos otros receptores de neurotransmisores como el receptor de acetil colina de tipo nicotínico y el receptor de serotonina tipo 3, [16,17]. Tanto GABA_A como GlyR son receptores pentaméricos cuyas subunidades definen un canal de Cl⁻ central; al activarse el receptor por la unión de un ligando se produce la hiperpolarización de la célula por aumento del flujo de Cl⁻, lo cual implica una disminución en la excitabilidad de la neurona y la inhibición de la propagación de estímulos nerviosos.

Se procedió entonces a realizar una búsqueda bibliográfica con el fin de identificar cuáles eran los aminoácidos de mayor relevancia en el sitio activo de unión del neurotransmisor GABA en el receptor GABA_A y en los sitios de unión de moduladores. Se verificó la presencia o ausencia de dichos aminoácidos en la secuencia del GlyR.

Un esquema ilustrativo de lo descrito hasta aquí puede encontrarse en la figura 1. Superadas todas las etapas anteriores, se procedió a buscar en literatura ligandos conocidos del receptor GlyR para evaluarlos en un modelo animal de actividad anticonvulsiva (ensayo scPTZ) capaz de identificar potenciales fármacos que actúen modulando la vía GABAérgica (agonistas o moduladores del receptor GABA_A).

Evaluación farmacológica: ensayo scPTZ en ratones

El ensayo scPTZ es un modelo animal agudo de convulsión, en el cual el episodio convulsivo es inducido artificialmente en el ratón mediante inyección subcutánea de un agente químico pro-convulsivante antagonista del neurotransmisor GABA: el pentilentetrazol (PTZ). Se utilizaron como animales de experimentación grupos de 6 ratones swiss pesando entre 18 y 23 gramos provistos por el bioterio de la Facultad de Veterinaria de la UNLP. Los animales fueron mantenidos en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y provistos de comida y agua *ad libitum*. Un volumen máximo de 10 ml/kg de la solución del fármaco candidato es administrado a los ratones por vía intraperitoneal (ip), en dosis de 30 y 100 mg/kg, siguiendo el Programa de Desarrollo de Fármacos Anticonvulsivos del NIH [18]. A 0.5 y 4 hs luego de la administración del fármaco candidato se administra una solución recientemente

¹ Nótese que dos proteínas pueden tener estructuras secundarias y terciarias similares sin que haya gran similitud en la estructura primaria (secuencia de aminoácidos).

preparada de PTZ 1.7% (85 mg/kg de ratón) por vía subcutánea. Este procedimiento produce convulsiones clónicas en el 97% de los animales no tratados con fármacos anticonvulsivantes. Los animales son observados por 30 minutos luego de la inyección, registrando ausencia o presencia de convulsiones clónicas y tónicas, tiempo de latencia de las convulsiones, muerte del animal y tiempo al que ocurre la muerte, comparando con un grupo control al que se le administra el vehículo sin el fármaco ensayado.

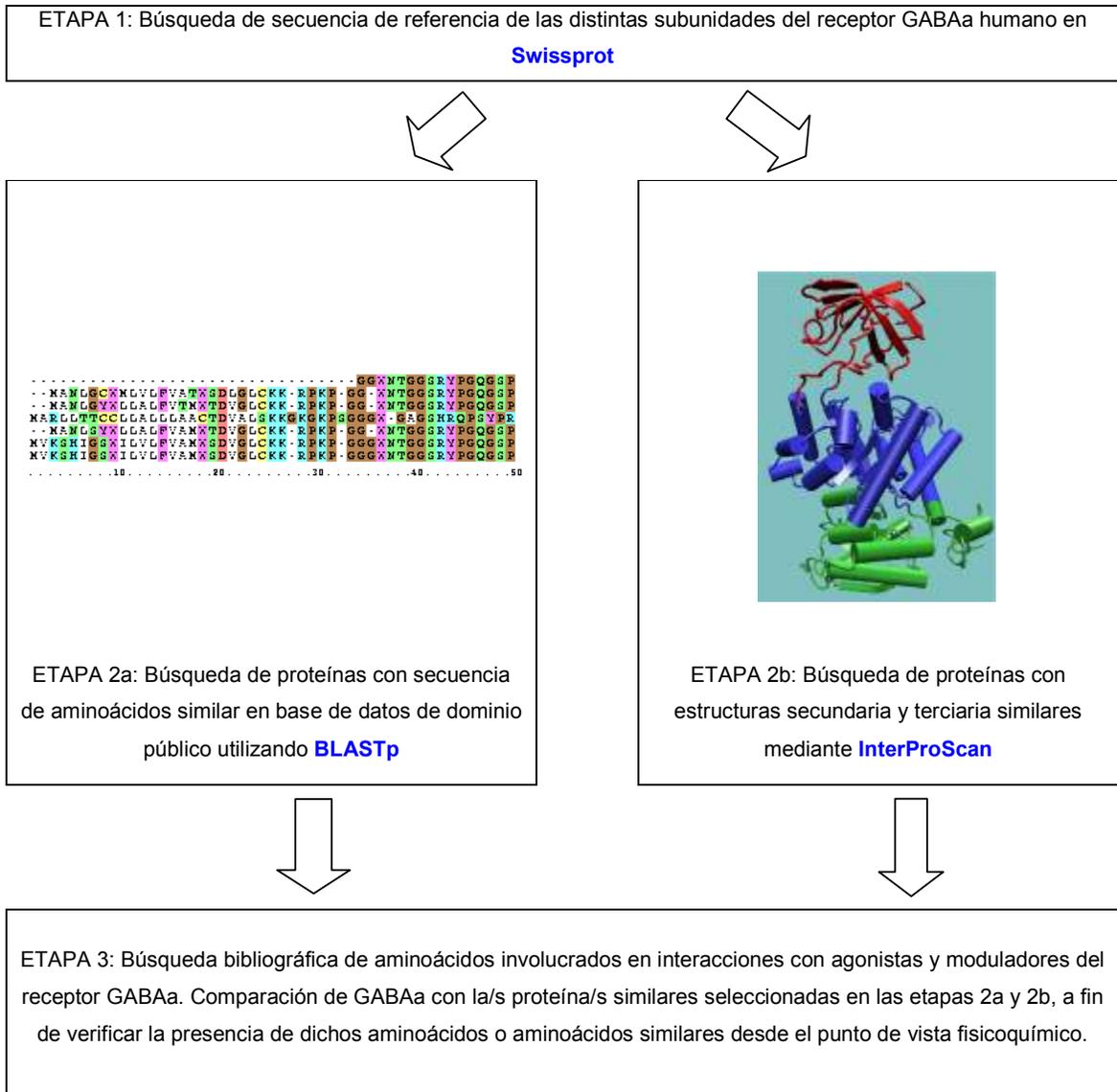


Figura 1. Secuencia de búsqueda de proteínas similares a las subunidades del receptor GABA_A.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos de InterProScan decidimos enfocarnos en la búsqueda de fármacos que actúen sobre el GlyR con la premisa de que, dado que tanto el receptor GABA_A como GlyR pertenecen a la misma familia de receptores siendo ambos canales de Cl⁻ activados por ligando, los ligandos activos sobre GlyR podrían ser activos sobre el receptor GABA_A.

La ejecución del BLAST para cada una de las subunidades devino en un listado de proteínas con secuencia similar. Para la subunidad α_1 se encontraron 3487, para la subunidad β_2 3633 y para la subunidad γ_2 3454 . Del listado de cada subunidad se encontró que 65 secuencias para α_1 pertenecían a alineamientos con GlyR, 55 para β_2 y 71 para γ_2 .

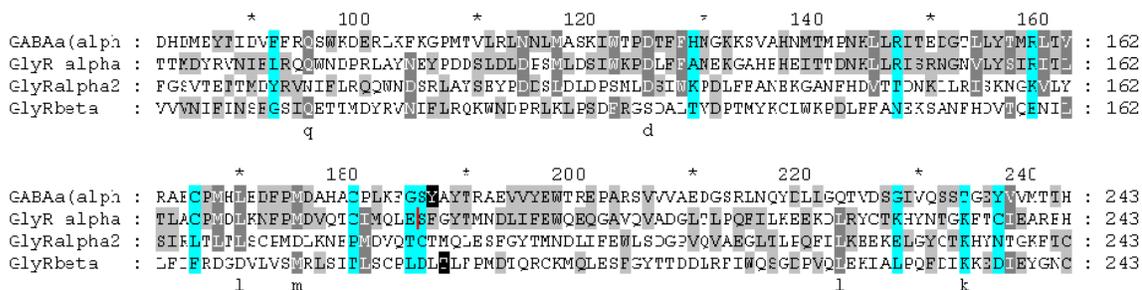
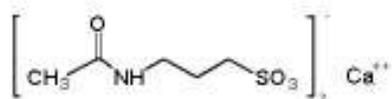


Figura 2: Se muestran los alineamientos de secuencia de la subunidad alpha 1 del receptor GABA_A contra la subunidad alpha 1, alpha 2 y beta del receptor de glicina. Los aminoácidos marcados con turquesa son importantes para el sitio activo GABA, y se observa que se encuentran preservados, o que las sustituciones son conservativas. Lo mismo ocurre al comparar las subunidades beta 2 y gamma 2 del GABA_A con las subunidades del receptor de glicina.

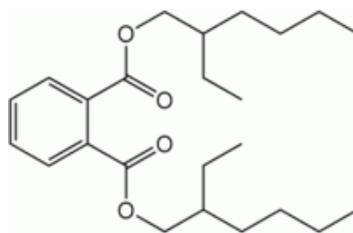
Al realizar un alineamiento entre las subunidades del receptor GABA_A y GlyR buscando que los aminoácidos relevantes para los sitios activos del receptor GABA_A estuvieran en el GlyR se encontró que muchos de los residuos que intervienen en la unión de ligandos al receptor GABA_A se encuentran preservados en el GlyR o sustituidos de manera conservativa, por aminoácidos de propiedades fisicoquímicas similares (Figura 2), lo que parecería sustentar la idea de que ambos receptores podrían tener ligandos comunes.

Estos resultados fueron respaldados con una búsqueda bibliográfica con el servicio SCOPUS (<http://www.scopus.com/home.url>): se encontraron 39 compuestos que interactúan con GlyR, de los cuales 33 han sido ensayados en el ensayo scPTZ con resultados positivos. Algunos ejemplos de ello son: Mentol [19], Sarcosina [20], D-Cicloserina (DCS) [21], Alopregnanolona [22]. Puede observarse que algunos de los mismos han sido ensayados en el scPTZ muy recientemente (años 2008-2010). De los compuestos restantes (ver Figura 3), dos han sido ensayados y han demostrado actividad anticonvulsiva en otro

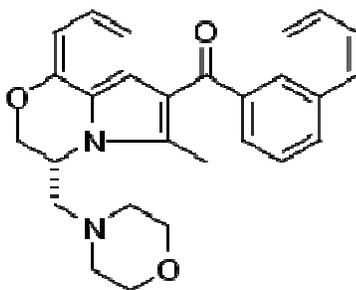
modelo animal de epilepsia (ensayo MES) (WIN 55,212-2 y SSR504734) [23, 24], uno es carcinogénico (DEHP) [25], uno es un amino ácido raro de origen espacial (isovalina) [26] y



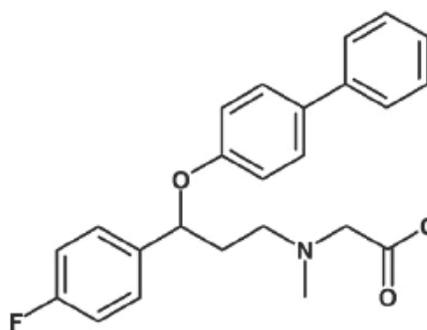
Acamprosato de calcio



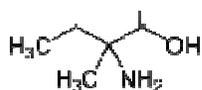
DEHP



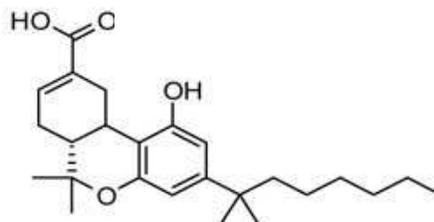
WIN 55,212-2



SSR504734



Isovalina



Ácido ajulémico

Figura 3. Estructuras de los 6 ligandos de GlyR que no han sido ensayados a la fecha en scPTZ. DEHP es carcinogénico y por lo tanto inviable como candidato a fármaco. De los restantes, sólo el acamprosato está disponible comercialmente.

dos de ellos son difíciles de adquirir comercialmente debido a su actividad psicotrópica (ácido ajulémico y WIN 55,212-2). Sólo el acamprosato de calcio, utilizado clínicamente en el tratamiento de deshabituación etílica, se encontraba disponible comercialmente. El mismo fue adquirido a Bosche Scientific (New Jersey, USA) y evaluado en el ensayo scPTZ.

Los resultados del ensayo farmacológico se presentan en la figura 4. Se observan diferencias estadísticamente significativas en el tiempo al que muere el roedor tras el episodio convulsivo, a dosis de 30 y 100 mg/kg de acamprosato a los 30 minutos de ser administrado ($p=0.05$ y $p=0.01$, respectivamente). Esto indicaría que el acamprosato podría actuar como proconvulsivamente, modulando negativamente la vía GABAérgica y potenciando el efecto de la acción convulsiva (la convulsión que presenta el grupo pretratado con acamprosato resulta ser más severa, por lo que se desencadena la muerte en los animales en un tiempo menor).

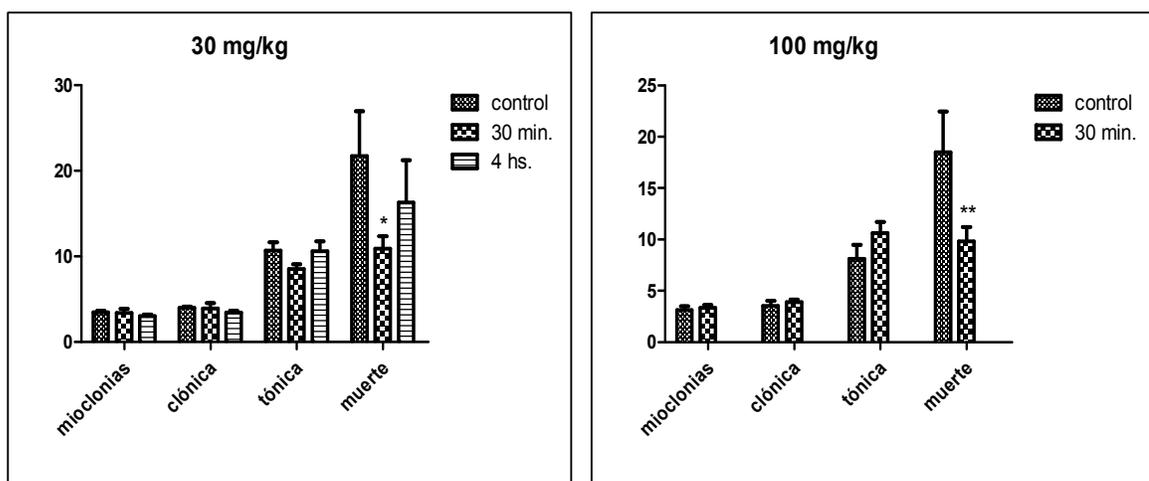


Figura 4. Tiempo (minutos) transcurrido desde la administración de PTZ y las distintas fases de la convulsión (mioclónica, clónica, tónica) y muerte. Se observa una disminución estadísticamente significativa (* $p=0.05$, ** $p=0.01$) en el tiempo al que ocurre la muerte luego del episodio convulsivo en los grupos de animales a los que se administró acamprosato cálcico, lo que estaría indicando actividad proconvulsivante.

CONCLUSIÓN:

En base a los resultados, podemos afirmar que la aplicación de la Bioinformática en la búsqueda de nuevos fármacos constituye una herramienta promisoriosa. El uso de la Bioinformática (búsqueda de proteínas con estructuras primaria, secundaria y terciaria similares a las de las subunidades del receptor GABA_A en bases de datos de proteínas de dominio público) permitió identificar la similitud entre el receptor GABA_A y el GlyR, y la potencial actividad moduladora de la vía GABAérgica de los ligandos conocidos del GlyR. 33 de los 39 candidatos a fármacos anticonvulsivos ya han sido reportados (algunos muy recientemente) como activos en el ensayo scPTZ. De los restantes, 1 fue descartado por su carcinogenicidad y sólo 1 (acamprosato de calcio) resultó disponible comercialmente. Los resultados de la evaluación del mismo en el ensayo scPTZ sugieren que el acamprosato modula negativamente las vías GABAérgicas, actuando como proconvulsivante. Se prevé

abordar, en un futuro, la síntesis y evaluación farmacológica de los candidatos remanentes no disponibles por vía comercial.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- Zhang J et al. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J. Genet. Genomics* 38: 95-109 (2011).
- 2.- Von Bubnoff A. Next-generation sequencing: the race is on. *Cell* 132: 721-23 (2008).
- 3.- Lunshof JE et al. Personal genomes in progress: from the Human Genome Project to the Personal Genome Project. *Dialogues Clin. Neurosci.* 12: 47-60 (2010).
- 4.- Lindblom A, Robinson PN. Bioinformatics for human genetics: promises and challenges. *Hum. Mutat.* 32: 495-500 (2011).
- 5.- Devos D, Valencia A. Practical limits of function prediction. *Proteins* 41: 98-107 (2000).
- 6.- Teufel A et al. Current bioinformatics tools in genomic biomedical research. *Int. J. Mol. Med.* 17: 967-73 (2006).
- 7.- World Health Organization. Fact sheet number 999: Epilepsy (2009).
- 8.- Bialer, M et al. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the seventh Eilat Conference (EILAT VII). *Epilepsy Res* 61: 1-48 (2004).
- 9.- French, J.A. Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia.* 48 Suppl. 1: 3-7 (2007).
- 10.- Löscher, W.; Schmidt, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: innovative strategies. *Epilepsy Res.* 69: 183-272 (2006).
- 11.- Simon, J. et al. Analysis of the set of GABA_A receptor genes in the human genome. *J. Biol. Chem.* 40 (2004), 41422-41435.
- 12.- Bailey, M. E. S. et al. Genomic mapping and evolution of human GABAA receptor subunit gene clusters. *Mamm. Genome* 10 (1999), 839-843.
- 13.- Bairoch, A et al. Swiss-Prot: Juggling between evolution and stability. *Briefings in Bioinformatics*, Vol 5, (2004) 39-55.
- 14.- McGinnis, S.; Madden T.L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acid Research*, Vol 32 (2004).
- 15.- Quevillon, A et al. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acid Research*, Vol 33, (2005).
- 16.- Webb, T.I.; Lynch, J.W. *Molecular Pharmacology of the Glycine Receptor Chloride Channel*. *Current Pharmaceutical Design*, Vol 13 (2007).
- 17.- Bowery, N.G.; Smart, T.G. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *British Journal of Pharmacology*, 147 (2006), 109-119.
- 18.- White, H.S. et al. The National Institute of Health Anticonvulsant Drug Development Program: Screening for Efficacy. *Adv. Neurol.* 76: 29-33 (1998).
- 19.- Zhang, X.-B. et al. A-type GABA receptor as a central target of TRPM8 agonist menthol. *PLoS ONE* 3: e3386 (2008).
- 20.- Socala, K. et al. Effects of sarcosine, a glycine transporter type 1 inhibitor, in two mouse seizure models. *Pharmacol.* 62: 392-6 (2010).
- 21.- Peterson, S.L.; Schwade, N.D. The anticonvulsant activity of D-cycloserine is specific for tonic convulsions. *Epilepsy Res.* 15: 141-8 (1993)
- 22.- Mareš, P. et al. Anticonvulsant action of allopregnanolone in immature rats. *Epilepsy Res.* 70: 110-7 (2006).
- 23.- Wallace, M. J. et al. Assessment of the role of CB₁ receptors in cannabinoid anticonvulsant effects. *Eur. J. Pharmacol.* 428: 51-7

(2001). 24.- Kalinichev, M. et al. Glycine transporter 1 (GlyT1) inhibitors exhibit anticonvulsant properties in the rat maximal electroshock threshold (MEST) test. *Brain Res.* 133: 105-13 (2010). 25.- Hasmall, S. C.; Roberts, R. A. The nongenotoxic hepatocarcinogens diethylhexylphthalate and methylnonoxifen induce DNA synthesis preferentially in octoploid rat hepatocytes. *Toxicol. Pathol.* 28: 503-9 (2000). 26.- Cooke, J.E. et al. Isovaline causes inhibition by increasing potassium conductance in thalamic neurons. *Neurosci.* 164: 1235-43 (2009).