

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



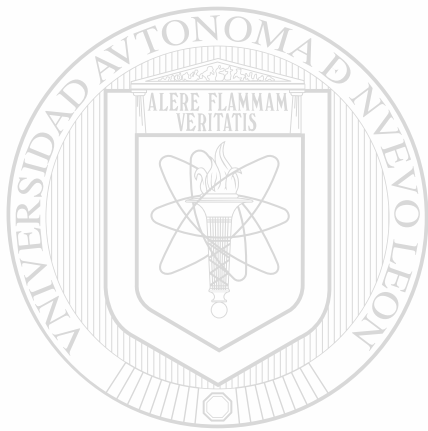
ESTUDIOS FUNCIONALES Y MOLECULARES
DE RECEPTORES GABA_c

POR

ATAULFO MARTINEZ TORRES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

NOVIEMBRE DEL 2000



ATAULFO MARTINEZ TORRES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

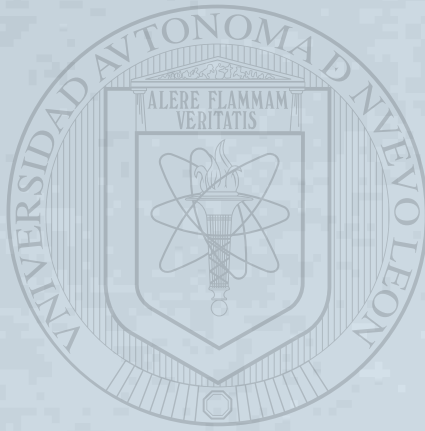
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
QM451
.M37
c.1



1080111681



UANL

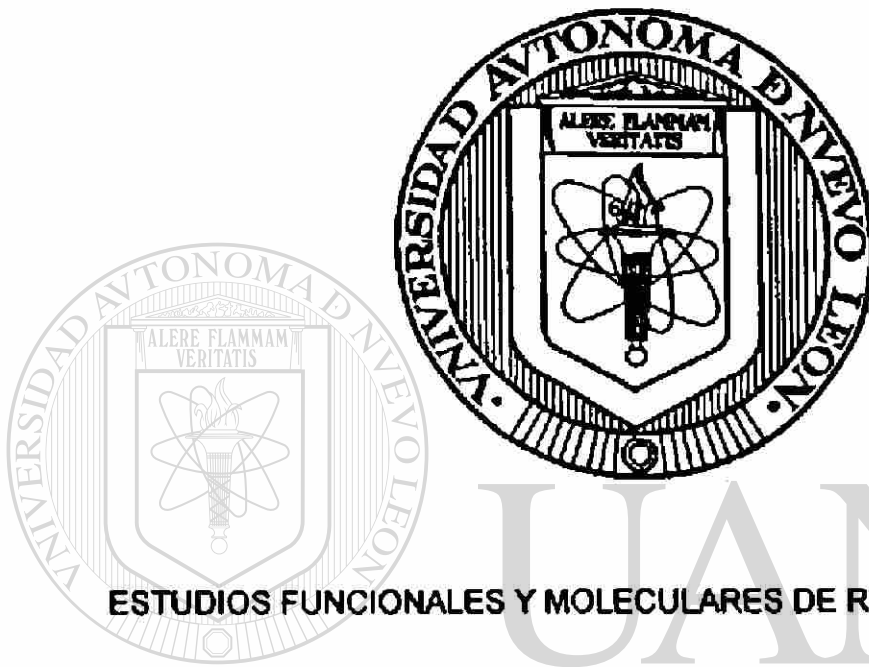
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIOS FUNCIONALES Y MOLECULARES DE RECEPTORES GABA_A

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

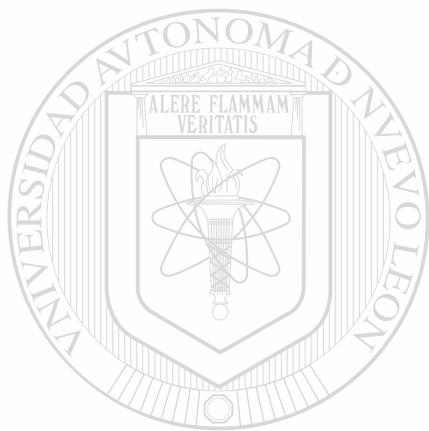
Ataúlfo Martínez Torres

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Noviembre del 2000

TD
9M4
-M37



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ESTUDIOS FUNCIONALES Y MOLECULARES DE RECEPTORES GABA_c

Aprobación de Tesis



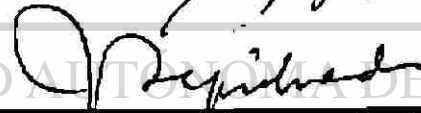
DR. RICARDO MILEDI
(Director)



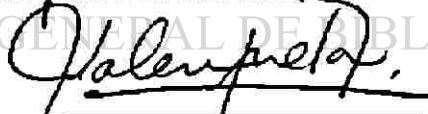
DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA
(Co-Director)



DRA. HERMINIA MARTÍNEZ RODRÍGUEZ



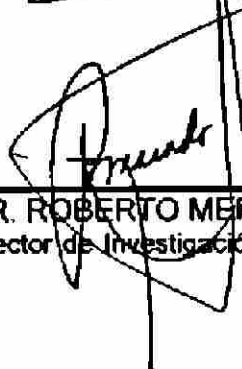
DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA



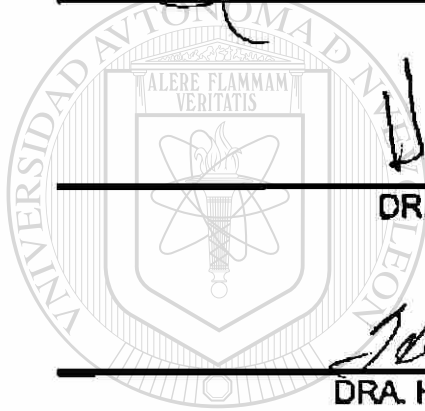
DR. JORGE VALENZUELA RENDÓN



DRA. AGNES REVOL



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Ataúlfo Martínez Torres

Fecha de Graduación: Noviembre, 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: Estudios Funcionales en Receptores GABA_c

Número de páginas: 93

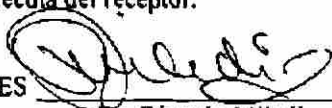
Candidato para el grado de Doctor en Ciencias
con especialidad en Biología Molecular e
Ingeniería Genética

Área de estudio: Biología Molecular de Neuroreceptores

Propósito y Método del Estudio: El presente trabajo describe las características moleculares y funcionales de la familia de neuroreceptores GABA_c, la cual es el producto de la expresión de al menos tres genes diferentes ($\rho 1$, $\rho 2$ y $\rho 3$) que codifican para los tres tipos de subunidades que pueden formar el receptor. Este estudio se abordó empleando técnicas de biología molecular y electrofisiología, usando como modelo experimental-funcional al oocito de *Xenopus laevis*. En la primera parte se describe la clonación y el análisis funcional de dos nuevas formas alternativas del receptor $\rho 1$ humano (llamadas $\rho 1\Delta 51$ y $\rho 1\Delta 450$), contrastando las diferencias entre el receptor original y las isoformas recién clonadas. Posteriormente se presenta el análisis de la expresión de los receptores GABA_c en diversas áreas del SNC. Esta parte se desarrolló empleando métodos de detección y clonación molecular, hibridación *in situ* y expresión funcional en oocitos de *Xenopus*. Finalmente, se estudiaron los posibles mecanismos de desensibilización del receptor $\rho 1$, para lo cual se siguieron dos estrategias. En la primera se estudió el papel que juegan los mecanismos de fosforilación en la actividad del receptor. Para esto se mutaron *in vitro* codones blanco para la enzima proteína cinasa C. En la segunda alternativa, se determinó si el dominio molecular que forma el canal iónico del receptor está involucrado en la baja tasa de desensibilización de $\rho 1$, mediante la construcción de genes quimera entre $\rho 1$ y la subunidad $\alpha 1$ del receptor de rápida desensibilización GABA_A.

Contribuciones y Conclusiones: Se demostró que $\rho 1\Delta 51$ forma receptores funcionales cuando son expresados en la membrana del oocito, mientras que la isoforma $\rho 1\Delta 450$ no es funcional, aún y cuando su RNA es traducido eficientemente por el oocito. El estudio de la distribución de los receptores GABA_c condujo a la determinación de la distribución celular en cerebelo, a la clonación y al análisis funcional de tres nuevos DNAs obtenidos a partir de bancos de DNA de cerebelo bovino ($\rho 1$ y $\rho 2$) y cerebro de rata ($\rho 3$). Finalmente, el estudio de los mecanismos de desensibilización del receptor $\rho 1$ mostró que los receptores mutados en los sitios de fosforilación tienen las mismas propiedades que los receptores silvestres mientras que los experimentos con DNA quimérico demostraron que el dominio que forma el canal iónico del receptor (*i.e.* el segundo segmento transmembranal) no es suficiente para transferir las características de desensibilización rápida y que para eso se requiere la cooperación de varios dominios distribuidos a lo largo de la molécula del receptor.

FIRMA DE LOS ASESORES


Dr. Ricardo Miledi


Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN AUTOBIOGRAFICO	viii

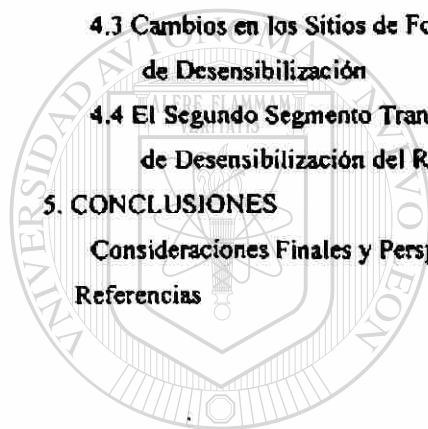
Capítulo	Página
I. INTRODUCCION	
I	
1.1 Generalidades de los Receptores del GABA	1
1.1.1 Los Receptores del GABA Inhibe el potencial Sináptico	1
1.1.2 Estructura de los Receptores Ionotrópicos	4
1.2 Características de los Receptores GABA_c	5
1.2.1 Los Receptores GABA _c se Expresan en la Retina de los Vertebrados	5
1.2.2 Existen al Menos tres Tipos de Subunidades de Receptores GABA _c	6
1.2.3 Diferencias Entre los Receptores GABA _A y GABA _c	8
1.2.4 Formas Alternativas de los Receptores GABA _A	10
1.3 Mecanismos de desensibilización de Receptores Ionotrópicos	12
1.3.1 Papel de la Fosforilación en la desensibilización de receptores ionotrópicos	12
1.3.2 Elementos estructurales del Receptor y su Papel en la desensibilización	13
1.4 El Oocito de <i>Xenopus</i> Como Modelo Experimental Para Estudiar Neuroreceptores y Canales Iónicos	14
1.4.1 Generalidades del oocito de <i>Xenopus laevis</i>	14
1.4.2 Los Oocitos de <i>Xenopus</i> Traducen RNAm Heetrólogo	15
1.5 Justificación	16
1.6 Objetivo General	16
1.7 Objetivos Particulares	16
2. MATERIAL Y METODOS	17
2.1 Origen de los Reactivos	17
2.2 Material Biológico y Equipo	18
2.3 Clonación y Estudios Funcionales y de Distribución de Formas Alternativas del la Subunidad p1	18
2.3.1 Tamizaje de Bibliotecas de DNAc de Retina	18
2.3.2 Propagación de la Biblioteca de DNAc y Transformación de Bacterias	19
2.3.3 Tamizaje Molecular	20

2.3.4 Re-propagación	20
2.3.5 Plásmidos de Expresión y Síntesis de Transcritos <i>in vitro</i> (RNAc)	21
2.3.6 Aislamiento de Oocitos de <i>Xenopus</i> y registro de Corrientes por la Técnica de dos Microelectrodos y Fijación de Voltaje	23
2.3.7 Construcción de Receptores en Fusión con la Proteína Verde Fluorescente (GFP)	24
2.3.8 Tamizaje de las Isoformas del Receptor $\rho 1$ en el SNC	25
2.4 Clonación Molecular, Análisis Funcional y Determinación de la Distribución de Receptores GABA _C en el Sistema Nervioso Central	27
2.4.1 Preparación del Tejido, Aislamiento de RNA y Análisis Funcional	27
2.4.2 Análisis por RT-PCR	27
2.4.3 Hibridación <i>in situ</i>	28
2.4.5 Tamizaje de una Biblioteca de DNAc de Cerebro de Rata	29
2.5 Mutaciones en los Sitios de Fosforilación del Receptor $\rho 1$ y Co-expresión con Receptores Asociados a Proteínas G	29
2.5.1 Mutaciones Dirigidas	29
2.5.2 Co-expresión de Receptores de Angiotensina (AT1) y $\rho 1$	31
2.5.3 Expresión de la Segunda Asa Intracelular de $\rho 1$ en <i>E. coli</i> y Fosforilación <i>in vitro</i>	31
2.6 Determinación del Papel del Segundo Segmento Transmembranal de $\rho 1$ en la Desensibilización del Receptor	33
2.6.1 Construcción de genes quiméricos por PCR y Ligación intermolecular	33

3. RESULTADOS

3.1 Clonación Molecular y Expresión Funcional de Formas Alternativas del Receptor $\rho 1$	35
3.1.1 Tres Isoformas del Receptor $\rho 1$ se Expresan en la Retina Humana	35
3.1.2 Expresión de $\rho 1\Delta 51$ y $\rho 1\Delta 450$ en Oocitos de <i>Xenopus</i>	37
3.1.3 Caracterización Farmacológica del Receptor $\rho 1\Delta 51$	39
3.1.4 Distribución del Receptor $\rho 1$ en Tejido Cerebral Bovino	41
3.1.5 Expresión de Receptores $\rho 1$ en Fusión con GFP	42
3.2 Los Receptores GABA _C se Expresan en el SNC y Forman Homo-oligómeros Funcionales al Expresarse en Oocitos de <i>Xenopus</i>	46
3.2.1 Expresión Funcional de Receptores del SNC en Oocitos y Ensayos de PCR	46
3.2.2 Los Receptores GABA _C se Expresan en las Células de Purkinje y de Golgi del Cerebelo de Rata	49
3.2.3 Dos Receptores GABA _C son Expresados en el Cerebelo Bovino	50
3.2.4 Un Receptor Similar a $\rho 3$ se Expresa en Cerebro de Rata Pero no	

Expresa Receptores Funcionales en Oocitos	54
3.3 Las Mutaciones en los Sitios Blanco de Fosforilación no Modifican la Tasa de Desensibilización de $\rho 1$	56
3.3.1 Expresión de Receptores Mutantes en Oocitos de <i>Xenopus</i>	56
3.3.2 La Segunda Asa Intracelular de $\rho 1$ no es Fosforilada <i>in vitro</i> por PKC o PKG	57
3.4 Determinación del Papel del Segundo Segmento Transmembranal de $\rho 1$ en la Desensibilización del Receptor	60
3.4.1 Expresión de los Receptores Quiméricos en Oocitos de <i>Xenopus</i>	60
4. DISCUSION	
4.1 Existen Tres Isoformas del Receptor $\rho 1$ Humano	65
4.2 Los Receptores GABA _C se Expresan en el Sistema Nervioso Central	68
4.3 Cambios en los Sitios de Fosforilación del Receptor $\rho 1$ no Afectan su Tasa de Desensibilización	71
4.4 El Segundo Segmento Transmembranal de $\rho 1$ no Determina la Baja Tasa de Desensibilización del Receptor	73
5. CONCLUSIONES	75
Consideraciones Finales y Perspectivas	76
Referencias	78



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

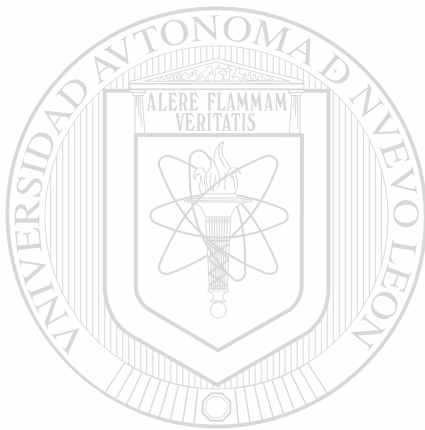
LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Modelo de la función inhibitoria de GABA en la sinapsis neuronal.	3
Figura 2. Modelo estructural de una subunidad de receptor de la familia de receptores ionotrópicos.	5
Figura 3. Corrientes generadas por GABA en oocitos inyectados con RNAm de retina	9
Figura 4. Detección por PCR de formas alternativas del receptor $\rho 1$ en la retina humana.	4
Figura 5. Posición de los oligonucleótidos utilizados en la PCR.	20
Figura 6. Mapa funcional del plásmido pSP64T- $\rho 1$.	22
Figura 7. Estrategia de construcción del plásmido de expresión de la quimera $\rho 1$ -GFP	26
Figura 8. Estrategia para la expresión de la proteína fusión MBP- $\rho 1$	32
Figura 9. Estrategia para la construcción de genes quimera	34
Figura 10. Tres isoformas del receptor $\rho 1$ se expresan en retina humana.	36
Figura 11. Expresión funcional de $\rho 1\Delta 51$ en oocitos de <i>Xenopus</i> .	38
Figura 12. Bloqueo de $\rho 1\Delta 51$ por iones de zinc.	39
Figura 13. Corrientes generadas por GABA, glicina y β -alanina en oocitos inyectados con el Plásmido de expresión de $\rho 1\Delta 51$	40
Figura 14. Análisis electroforético de los productos de RT-PCR de $\rho 1$ y $\rho 1\Delta 51$ obtenidos de diversas áreas del cerebro.	41
Figura 15. Caracterización funcional de $\rho 1$ -GFP.	43
Figura 16. Expresión del receptor $\rho 1\Delta 450$ -GFP.	44
Figura 17. Expresión funcional de RNA polia ⁺ de cerebelo y corteza.	47
Figura 18. Tamizaje de genes similares a GABA _C .	48
Figura 19. Determinación de la expresión de los receptores $\rho 1$ – $\rho 3$ por hibridación <i>in situ</i> en cortes de cerebelo.	50
Figura 20. Secuencia aminoacídica predicha a partir de la secuencia nucleotídica de los receptores bp1 y bp2 clonados de cerebelo bovino.	52
Figura 21. Caracterización funcional de los receptores bp1 y bp2 clonados a partir de cerebelo bovino.	53
Figura 22. Secuencia aminoacídica del receptor rp3.	55
Figura 23. El receptor $\rho 1$ mutado en los aminoácidos blanco para la proteína-quinasa C conserva las propiedades del receptor silvestre	56
Figura 24. La activación del receptor AT1 inhibe las corrientes del receptor $\rho 1$ y de $\rho 1_{(3425,434,441A)}$.	58
Figura 25. Construcción de plásmidos de expresión, inducción de	

la expresión en <i>E. coli</i> .	59
Figura 26. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas de fusión.	60
Figura 27. Caracterización funcional de la quimera $\rho 1/\alpha 1$.	63
Figura 28. Caracterización funcional de la quimera $\rho 1_{(e17M2)}$.	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Algunas diferencias funcionales, estructurales y farmacológicas entre los receptores GABA _A y GABA _C	7
---	---



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AT	angiotensina
bic	bicuculina
CMV	citomegalovirus
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
g	fuerza de gravedad
GABA	γ-amino butirato
GFP	proteína verde fluorescente
μ	micrometros
MBP	proteína de unión a maltosa
μl	microlitros
ml	mililitros
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PKC	proteína cinasa C
PKG	proteína cinasa dependiente de trifosfato de guanosina
RNA	ácido ribonucleico
RNAc	RNA copia
RNAm	RNA mensajero
RT-PCR	Retrotranscripción-PCR
s	segundos
SDS	dodecil sulfato de sodio
SNC	sistema nervioso central
TM2	región transmembranal 2
TPMPA	(1,2,5,6-Tetrahidropiridina-4-il)metilfosfonato

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al esfuerzo de todo un grupo de valiosos asesores, colaboradores y amigos, que me dieron su apoyo durante todo el tiempo en el que estuve dedicado a sacar adelante los experimentos mostrados en este trabajo.

Al Dr. Ricardo Miledi, cuya guía ha sido pieza fundamental en mi formación no solo en el ámbito científico, que ha sido una experiencia excepcional, sino también en mi desarrollo personal.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña por haberme venido enseñando el oficio de la Biología Molecular desde que estudiaba la carrera de Biólogo (tiempo antes de hacer mi primer PCR).

A la comisión de tesis: Dra. Herminia G. Martínez, Dra. Agnes Revol, Dr. Julio Sepúlveda y Dr. Jorge Valenzuela.

Al Dr. Angelo Demuro, por haber realizado experimentos claves para la caracterización final de varios de los receptores construidos y clonados; sin su colaboración los objetivos planteados en este trabajo no hubiesen tenido los alcances aquí descritos.

A los Drs. Jesús García Colunga y Daniel J. Calvo por sus valiosas críticas a los experimentos.

A Joseph W. Backus, Thao D. Nguyen y Max Nguyen en orden cronológico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo en estos tres años con una beca crédito.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Ataúlfo Martínez-Torres

Candidato para el grado de:

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Campo de Estudio: Biología Molecular de Neuroreceptores

Tesis: ESTUDIOS FUNCIONALES Y MOLECULARES DE RECEPTORES GABA_C

Biografía:

Datos personales: Nacido en Monterrey, N.L. el 17 de junio de 1967. Hijo de Adolfo Martínez Hernández y Graciela Torres Aranda.

Educación: Preparatoria No. 9 de la UANL. Biólogo por la Facultad de Ciencias

Biológicas de la UANL en 1991. Maestro en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética por la Facultad de Medicina de la UANL en 1994.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES DE LOS RECEPTORES DEL GABA

1.1.1 Los Receptores del GABA Inhiben el Potencial Sináptico.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central de todos los vertebrados, incluyendo los humanos. El papel esencial del GABA en el sistema nervioso central es inhibir el potencial sináptico excitatorio de las neuronas (Nicholls *et al*, 1993). Esto es, impedir que una neurona en un momento determinado sea capaz de iniciar un potencial de acción (Fig. 1). Este aminoácido es sintetizado en las neuronas a partir de la descarboxilación del L-glutamato y ejerce su acción inhibitoria actuando sobre al menos tres distintos tipos de neuroreceptores de membrana, los cuales son genética, funcional y farmacológicamente distintos. Estos receptores se agrupan en las familias GABA_A, GABA_B y GABA_C (Enna y Bowery, 1997).

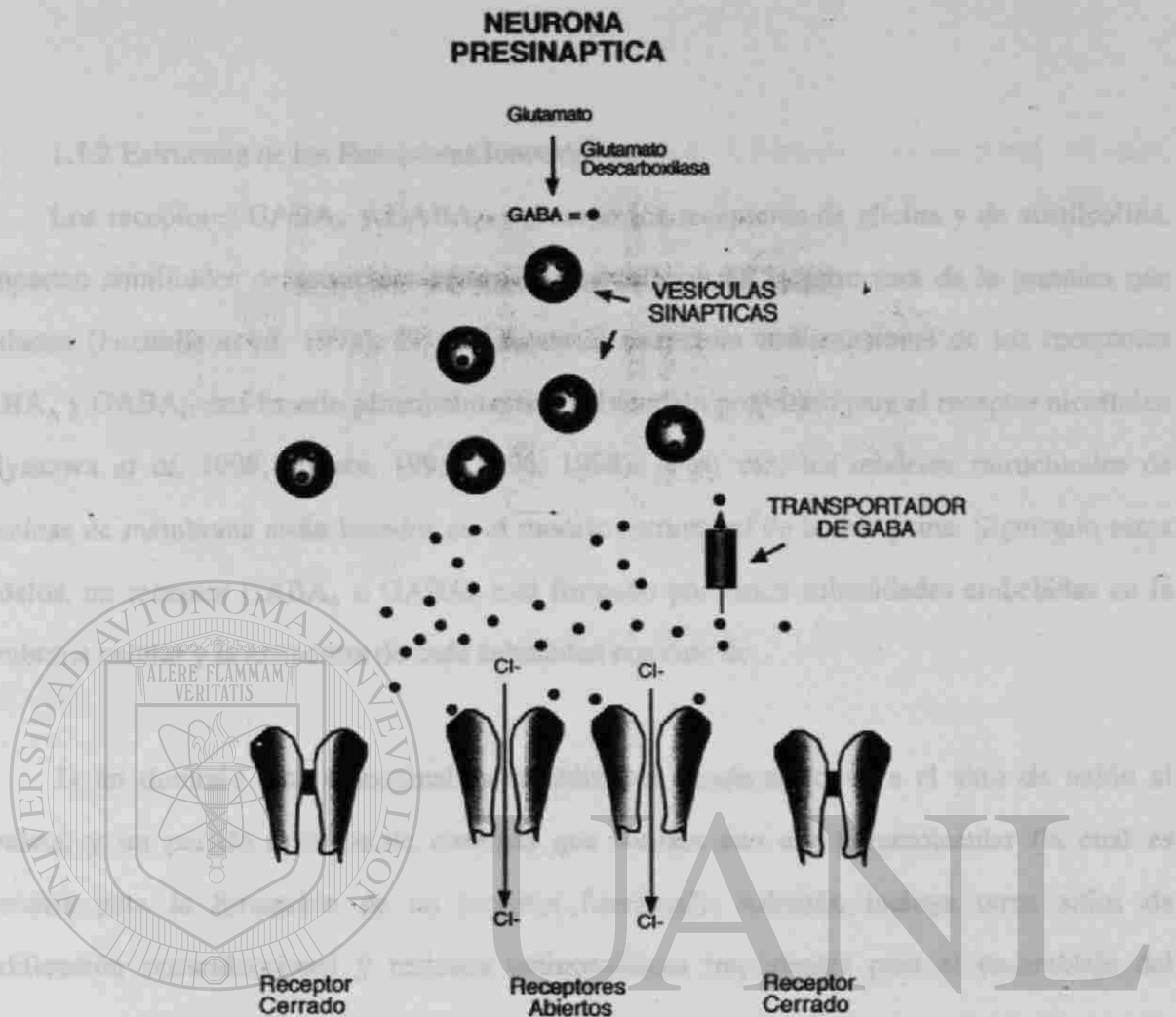
Las familias GABA_A y GABA_C son miembros de una superfamilia génica de receptores ionotrópicos (es decir, receptores que en una configuración dada forman por sí mismos un canal iónico) la cual incluye receptores de otros neurotransmisores, tales como los receptores de glicina y de acetilcolina (Xue 1998; Russek *et al*, 1999). Por otro lado, el receptor GABA_B forma parte de la superfamilia de receptores metabotrópicos. Estos receptores están asociados a proteínas G y la familia abarca una gran variedad de receptores con funciones múltiples y con distribución y

exhiben diversidad funcional como consecuencia de ser codificados por dos genes y de la formación de isoformas originadas por "splicing" alternativo (Isomoto *et al*, 1998).

El GABA ejerce su función inhibitoria sobre las neuronas propiciando un ambiente más negativo en el interior celular (hiperpolarización), haciendo más difícil el inicio de un potencial de acción. Los eventos que llevan a la hiperpolarización de la neurona son similares cuando se activan los receptores GABA_A o GABA_C y difieren de los eventos generados por los receptores GABA_B.

Cuando un receptor GABA_A o GABA_C es activado por GABA, su estructura molecular cambia y con eso abre un canal que es permeable principalmente al ión cloro (Cl⁻) (Fig. 1). La súbita entrada de este ión, con carga eléctrica negativa, hiperpolariza la neurona y en este estado, la generación de un potencial de acción se torna más difícil, de ahí el efecto inhibitorio del neurotransmisor (Nicholls *et al*, 1993).

Así, la inhibición sináptica se puede llevar a cabo rápidamente por medio de los receptores GABA_A y la inhibición puede ser llevada a cabo lentamente, pero por largos períodos de tiempo, cuando los receptores GABA_B son activados.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

NEURONA POSTSINAPTICA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 1. Modelo de la función inhibitoria de GABA en una sinapsis neuronal. El neurotransmisor GABA se sintetiza a partir de la descarboxilación del L-glutamato (que a su vez es un neurotransmisor excitatorio). Las moléculas de GABA son empaquetadas en vesículas sinápticas las cuales, con un estímulo adecuado, se fusionan a la membrana plasmática permitiendo la salida del neurotransmisor hacia el surco sináptico. El GABA se une con los receptores postsinápticos (en este caso GABA_A o GABA_C) los cuales modifican su estructura y permiten la entrada de iones Cl⁻. Esta súbita entrada propicia la hiperpolarización de la neurona, con la cual se inhibe la formación de potenciales sinápticos excitatorios y potenciales de acción. Simultáneamente, un transportador de membrana recapta el GABA y lo reintroduce al interior de la neurona presináptica.

1.1.2 Estructura de los Receptores Ionotrópicos.

Los receptores GABA_A y GABA_C, así como los receptores de glicina y de acetilcolina, comparten similitudes de estructura génica que se reflejan en la estructura de la proteína que producen (Nicholls *et al*, 1993). El modelo de la estructura tridimensional de los receptores GABA_A y GABA_C está basado principalmente en el modelo propuesto para el receptor nicotínico (Miyazawa *et al*, 1999; Unwin, 1995, 1996, 1998). A su vez, los modelos estructurales de proteínas de membrana están basados en el modelo estructural de la rodopsina. Siguiendo estos modelos, un receptor GABA_A o GABA_C está formado por cinco subunidades embebidas en la membrana celular y la estructura de cada subunidad consiste de:

1) un dominio amino terminal extracelular en donde se localiza el sitio de unión al agonista, y un par de residuos de cisteínas que forman una asa intramolecular (la cual es necesaria para la formación de un receptor funcional). Además, incluye otros sitios de modificación postraduccional y residuos aminoacídicos importantes para el ensamblaje del receptor.

2) Cuatro dominios formados por residuos aminoacídicos hidrofóbicos, los cuales forman regiones que están integradas en la membrana celular. El segundo dominio transmembranal es de importancia primordial ya que de acuerdo a este modelo, esta región forma la pared del canal iónico.

3) Dos asás intracelulares. Una de ellas conecta al primer y segundo segmentos transmembranales y la segunda al tercer y cuarto dominios transmembranales. La segunda asa contiene señales de modificación postraduccional y entre éstas se encuentran señales para la fosforilación por la enzima proteína-cinasa C (Fig. 2).

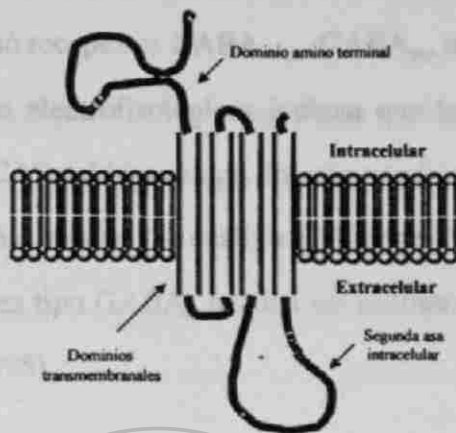


Figura 2. Modelo estructural de una subunidad de receptor de la familia de receptores ionotrópicos. Los receptores de la familia de receptores ionotrópicos están formados por cinco subunidades. Cada subunidad tiene dominios evolutivamente conservados como: el dominio amino-terminal extracelular, donde se encuentra el sitio de unión al agonista; cuatro dominios transmembranales; y un asa intracelular grande con residuos sujetos a modificaciones postraduccionales.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS RECEPTORES GABA_C

1.2.1 Los Receptores GABA_C se Expresan en la Retina de los Vertebrados.

Previo a la clonación de los genes que codifican para los receptores GABA_C, las características de estos receptores fueron estudiadas utilizando diversas metodologías: 1) al inyectar el RNAm extraído de retina en oocitos de la rana *Xenopus laevis* y caracterizando los receptores producidos en la membrana del oocito electrofisiológica y funcionalmente (Polenzani *et al*, 1991; Woodward *et al*, 1992a,b,c, 1993). Después de estos reportes, 2) se determinó en qué regiones del SNC y en qué tipos celulares de la retina son expresados, utilizando hibridación *in situ* e inmunocitoquímica (Enz *et al*, 1996; Koulen *et al*, 1997a,b; Salceda *et al*, 1993), y 3) mediante el registro electrofisiológico directo en células de la retina, tales como las células horizontales del cono de la rata, las células del ganglio retinal de la tortuga, las células amacrinas y ganglionares de la salamandra, y en las células horizontales de los bastones de rata y percha (Dong y Werblin, 1995; Liu y Lasater, 1995; Luckasiewicz *et al*, 1994; Luckasiewicz y Wong 1997; Luckasiewicz y Shields, 1998; Nelson *et al*, 1999; Qian y Dowling, 1993, 1994, 1995; Yeh *et al*, 1996).

Puesto que inicialmente estos receptores se descubrieron en la retina de mamíferos se les denominó receptores GABA_{retina}, GABA_{ret} o GABA_ρ (Polenzani *et al*, 1991). Sin embargo, otros hallazgos electrofisiológicos indican que los receptores GABA_C pueden estar presentes en las células CA3 del hipocampo durante estadios tempranos del desarrollo murino (Strata y Cherubini 1994). Así mismo, el análisis por hibridación de RNA en filtros ('Northern blots') sugiere que receptores tipo GABA_C pueden ser encontrados en cerebelo e hipocampo de mamíferos (O'Hara *et al*, 1995).

1.2.2 Existen al Menos Tres Tipos de Subunidades de Receptores GABA_C

Como se mencionó anteriormente, hasta ahora se han clonado tres diferentes genes que pertenecen a la familia GABA_C y se les ha denominado ρ1, ρ2 y ρ3 (Cutting *et al*, 1991, 1992; Ogorusu *et al*, 1997; Qian *et al*, 1997, 1998; Shingai *et al*, 1996; Wang *et al*, 1994). Todos ellos son expresados abundantemente en la retina y preservan las características anteriormente mencionadas que los distinguen como receptores GABA_C. Cada uno de ellos comparte entre un 70 y un 77% de similitud en su secuencia aminoacídica y alrededor de un 30 al 35% de similitud con los miembros de los receptores GABA_A y receptores a glicina.

Las tres subunidades (ρ1, ρ2 y ρ3) del receptor GABA_C son capaces de formar receptores funcionales cuando son expresados en sistemas heterólogos (oocitos de *Xenopus* o células en cultivo), sin requerir de ninguna subunidad accesoria (Calvo *et al*, 1994; Cutting *et al*, 1991, 1992; Kusama *et al*, 1993a,b; Ogorusu *et al*, 1996, Shimada *et al*, 1993; Wang *et al*, 1994). Sin embargo, algunos reportes indican que la subunidad ρ2 de rata no forma receptores *homo-oligoméricos* funcionales y requiere la cooperación de la subunidad ρ1 para ensamblar un receptor funcional (Zhang *et al*, 1997). Esto contrasta con las características de las subunidades ρ2 de humanos y peces, las cuales forman *homo-oligómeros* funcionales (Cutting *et al* 1992,

Qian y Dowling, 1997, 1998). Por tanto, se necesitarán estudios más detallados para apoyar o descartar la noción de que la subunidad $\rho 2$ de rata no es funcional.

Los genes $\rho 1$ y $\rho 2$ han sido ubicados en la región q21-23 del cromosoma 6 humano y forman un agrupamiento de genes organizados en tandem (Cutting *et al*, 1992). Es interesante señalar que en esta misma región se localiza un locus asociado a la retinitis pigmentosa del tipo autosómica recesiva (Ruiz *et al*, 1998); sin embargo, aún no se define si existe una relación entre la enfermedad y mutaciones o alteraciones en la expresión de los receptores ρ .

El arreglo en tandem de los genes de las subunidades ρ concuerda con la evolución del arreglo multigénico de los genes GABA_A, ya que éstos se disponen en varios loci en paquetes de tres a cinco genes incluyendo algunos que codifican para diferentes subunidades α , β y γ , y los cuales están distribuidos en varios cromosomas (Bailey *et al*, 1999; Glatt *et al*, 1997; Greger *et al*, 1995; Kosterzewa *et al*, 1996; Russek *et al*, 1994; Sinnott *et al*, 1993).

Tabla 1

Algunas diferencias funcionales, estructurales y farmacológicas entre los receptores GABA_A y GABA_C

	GABA _A	GABA _C
Subunidades del receptor	$\alpha 1-6, \beta 1-4, \gamma 1-4, \delta, \epsilon/\chi$	$\rho 1, \rho 2, \rho 3$
Tipo de asociación	Hetero-oligómero	Homo-oligómero* ¹
Desensibilización	Rápida	Lenta o nula
Resistencia a bicuculina	No	Si
Distribución en el SNC	Abundante	Principalmente en retina* ²

*1. La subunidad $\rho 2$ de rata tiene una mutación en su extremo amino-terminal, lo que aparentemente impide formar homo-oligómeros funcionales. Sin embargo, las subunidades $\rho 2$ de humano y peces si son funcionales.

*2 Recientemente se encontró que el RNAm de $\rho 2$ es expresado en bajas cantidades en el cerebro humano. En el presente trabajo se presentaran pruebas de que otras subunidades GABA_C son expresadas en el cerebelo de mamífero.

1.2.3 Diferencias Entre los Receptores GABA_A y GABA_C

Existen muy claras diferencias estructurales entre los receptores GABA_A y GABA_C, pese a que ambos son miembros de una misma familia génica y que responden al mismo neurotransmisor. Por una parte, los receptores GABA_C son *homo-oligómeros* es decir, están formados por cinco subunidades idénticas. Estas subunidades son el producto de la expresión de tres genes y se les denomina $\rho 1$, $\rho 2$ y $\rho 3$. (Amin y Weiss, 1994; Calvo *et al*, 1994; Calvo y Miledi, 1995; Cutting *et al*, 1991). En contraste, los receptores GABA_A son *hetero-oligómeros* que para ser funcionales requieren el acoplamiento de al menos dos tipos de subunidades (α y β), siendo además necesario el ensamblaje de otras subunidades accesorias (γ , δ , ϵ) para adquirir todas las características farmacológicas y electrofisiológicas propias de los receptores GABA_A presentes en las neuronas (Connolly *et al*, 1996; Fritschy *et al*, 1997; Prichett *et al*, 1988).

Otra característica que distingue a las dos clases de receptores radica en las diferencias funcionales de sus mecanismos de desensibilización. Por ejemplo, cuando los receptores GABA_A se activan permiten la entrada de Cl⁻ al interior de la célula y después de unos cuantos segundos de activación, el receptor inicia un declive en la amplitud de la corriente generada, pese a la presencia continua del agonista (Polenzani *et al*, 1991; Celentano y Wong 1994; Cash y Subbarao 1988; Tia *et al*, 1996) (Fig. 3). Aún más, si el agonista se aplica repetidamente las respuestas subsecuentes disminuyen en su amplitud. En cambio, en los receptores GABA_C estos efectos no suceden así (Polenzani *et al*, 1991; Woodward *et al*, 1992a,b,c 1993). La presencia del agonista, aún después de diez minutos o más de exposición, hace que disminuya la respuesta en apenas un 8-10% y aplicaciones repetidas del agonista no llevan a una disminución de las respuestas subsecuentes. Es decir los receptores GABA_C prácticamente no se desensibilizan.

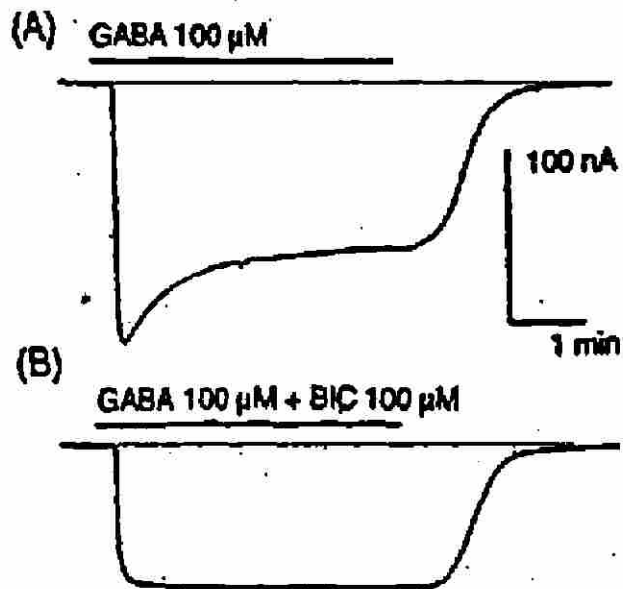


Figura 3. Corrientes generadas por GABA en oocitos inyectados con RNAm de retina. Las respuestas a GABA en estos oocitos son mixtas, ya que expresan ambos tipos de receptores. A) Corriente generada por GABA a 100 μM ; la cual muestra tanto el componente de GABA_A como el GABA_C (el cual no desensibiliza) y que además, como se muestra en B) no es bloqueado por bicuculina, antagonista específico de los receptores GABA_A (Tomado de Polenzani *et al*, 1991).

Las diferencias que existen entre las secuencias aminoacídicas de ambas clases de receptores resultan en divergencias de sus características farmacológicas. Por ejemplo, clásicamente los receptores GABA_A se distinguen porque son antagonizados por el alcaloide bicuculina (Johnston 1972), mientras que los receptores GABA_C no son afectados por este alcaloide (Polenzani *et al*, 1991). Por otra parte, las benzodiazepinas (que son moléculas ampliamente utilizadas en la clínica como antidepresivos y relajantes), tienen un efecto directo sobre los receptores GABA_A , modulándolos de tal modo que incrementan su acción inhibitoria al favorecer una mayor hiperpolarización neuronal (Costa y Guidotti, 1996). Estas benzodiazepinas no tienen efecto alguno sobre los receptores GABA_C (Woodward *et al*, 1993), a excepción de algunas circunstancias especiales (Calvo y Miledi, 1998).

Por otra parte, en células HEK293 transfectadas con plásmidos de expresión transitorios del receptor $\text{GABA}_A(\alpha\beta 1)$ o de la subunidad $\rho 1$, el agente hipnótico-sedativo 2,2,2-

tricloroetanol tiene acciones opuestas sobre los receptores formados. Por un lado, incrementa las corrientes generadas por el receptor $GABA_A(\alpha 2\beta 1)$, mientras que a las mismas concentraciones no modifica las corrientes de $\rho 1$, aunque lo inhibe a altas (Krasowski *et al*, 1998).

El detergente Bio-Soft-62, el cual es un sulfonado lineal alquil bencénico también tiene efectos opuestos sobre los receptores $GABA_A$ y $\rho 1$ cuando éstos son expresados en oocitos de *Xenopus*. Por ejemplo, a una concentración entre el 0.0001 y el 0.01% incrementa las corrientes generadas por los receptores $GABA_A(\alpha 1\beta 2)$ y $GABA_A(\alpha 1, \beta 2, \gamma 2L)$, entre un 21 a un 458%. Por otra parte, el receptor formado por $\rho 1$ es inhibido aproximadamente un 72% a una concentración del detergente del 0.001% (Machu *et al*, 1998).

1.2.4 Formas Alternativas de los Receptores $GABA_A$.

El potencial codificante de los genes eucarióticos se incrementa mediante mecanismos postranscripcionales como la remoción alterna de intrones ('splicing' alternativo), la selección de promotores, sitios de poliadenilación alternativos y por la edición del RNAm (Singer y Berg 1991). Los eventos de "splicing" son particularmente complejos en el SNC y son comunes en algunos genes de neuroreceptores, donde la remoción diferencial de intrones produce subunidades que confieren propiedades diferentes al receptor (Ashiya y Grabowski, 1997, Lopez, 1998, Wang y Grabowski, 1996, Zhang *et al*, 1999). Particularmente, los genes de las subunidades $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\gamma 2$ de los receptores $GABA_A$, aumentan su potencial codificante al remover intrones en forma alternativa (Huntsman *et al*, 1998; Jones *et al*, 1996; Liu *et al*, 1998; McKinley *et al*, 1997; Zhang *et al*, 1996). Este mecanismo también ocurre en algunos genes de receptores ionotrópicos de invertebrados (Bamber *et al*, 1999; Hosie y Satelle 1996). También miembros de las familias génicas de receptores nicotínicos (Mileo *et al* 1995), NMDA (Luque *et al* 1994) y glutamato (Hampson *et al* 1994) producen formas alternativas a partir de un solo gen, lo que complementa la diversidad de receptores debida a la existencia de familias multigénicas para incrementar la complejidad del SNC.

Estudios iniciales desarrollados por R. Miledi y A. Vázquez sugerían que en bancos de DNAC de retina humana existirían dos isoformas menores de la subunidad $\rho 1$, las cuales aparentemente eran formadas por eventos de "splicing" alternativo. La figura 4 muestra un experimento donde se utilizó PCR para tamizar una biblioteca de DNAC de retina humana en busca de secuencias semejantes a $\rho 1$. Como se puede apreciar en esta figura, la presencia de diferentes fragmentos indican que potencialmente el gen $\rho 1$ podría derivar al menos tres transcritos, sin embargo la evidencia no era lo suficientemente fuerte por carcer de la secuencia nucleotídica de éstos y de clonas derivadas de bancos de genes. Como se mostrará mas adelante, en este trabajo se abordó la clonación molecular, determinación de la secuencia nucleotídica y expresión funcional de estas supuestas isoformas.

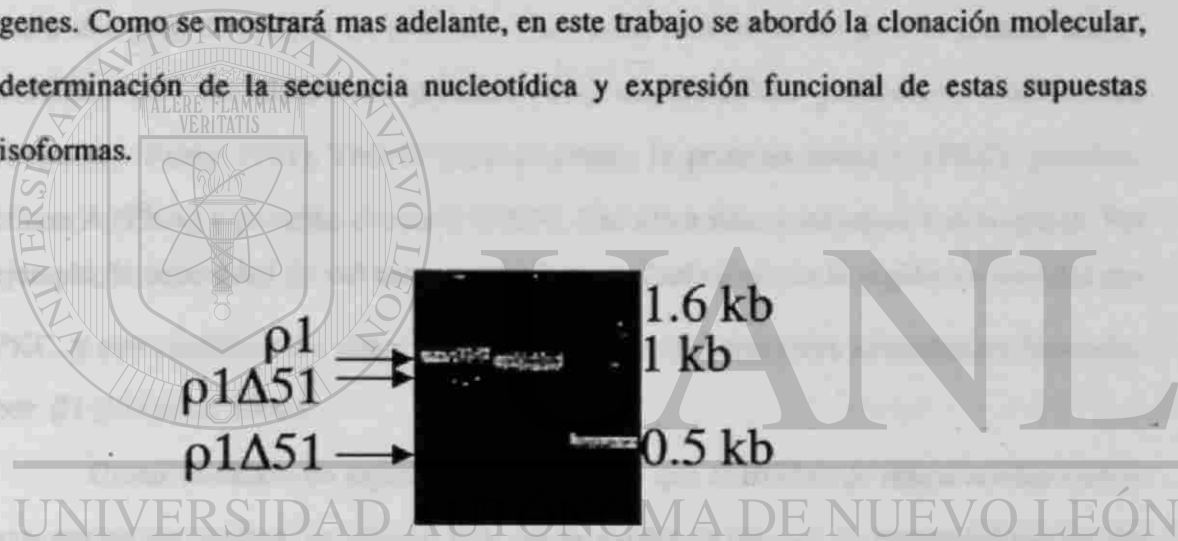


Figura 4. Detección por PCR de formas alternativas del receptor $\rho 1$ en la retina humana. El análisis inicial de una biblioteca de DNAC de retina mostró tres productos de amplificación de PCR. Estos tres productos fueron resueltos electroforéticamente y como se distingue en esta fotografía corresponden a: 1) $\rho 1$, 2) la nueva forma $\rho 1\Delta 51$ y 3) a una tercera forma que se denominó $\rho 1\Delta 450$.

1.3 MECANISMOS DE DESENSIBILIZACION DE RECEPTORES IONOTROPICOS

1.3.1 Papel de la Fosforilación en la Desensibilización de Receptores Ionotrópicos.

Recientemente, muchos estudios sobre la regulación funcional de neuroreceptores se han enfocado sobre el papel que juegan las enzimas de modificación postraducciona, tales como las cinasas (Lin *et al*, 1996; McDonald y Moss 1994; Moss *et al*, 1992a,b; Swope *et al*, 1992). Esta familia de enzimas transfiere grupos fosforilo a partir de ATP hacia una gran diversidad de proteínas blanco. La familia de las proteín-cinasas abarca alrededor de cien diferentes proteínas con características particulares individuales (Pearson y Kemp 1991). Tres de estas proteínas, la proteína-cinasa C (PKC), proteína-cinasa A (PKA) y proteína-cinasa G (PKG), fosforilan neuroreceptores ionotrópicos. Por ejemplo, la subunidad $\beta 1$ del receptor $GABA_A$ es fosforilada en la región intracelular por PKC, y esta modificación altera las propiedades de los receptores ensamblados formados por $\beta 1$ (Lin *et al*, 1996).

Como resultado de algunos estudios en los que el RNAm de retina bovina fueron expresados en oocitos, se obtuvo una fuerte evidencia de que la desensibilización del receptor $\rho 1$ puede ser modificada por el estado de fosforilación en el que se encuentra en el oocito. A menudo, cuando los receptores $GABA_C$ son activados 5-10 veces sucesivas, la magnitud de las repuestas crece progresivamente. Si en el mismo oocito se activa un receptor que este acoplado a proteínas G, como por ejemplo el receptor endógeno a suero (Tigyi *et al*, 1990), esto inicia una serie de reacciones que involucran la activación y desactivación simultánea de una gran variedad de proteín-cinasas y fosfatasas. Toda esta cascada de eventos modifica la magnitud de las corrientes generadas por el receptor $GABA_C$ de retina y muy posiblemente involucra la modificación de su estado de fosforilación.

Además, existe evidencia de que algunos receptores del tipo GABA_A modifican su tasa de desensibilización cuando son fosforilados (Leidenheimer *et al*, 1992; Lin *et al*, 1996; Moss *et al*, 1992a,b). Con el fin de saber si los receptores GABA_C, formados exclusivamente de la subunidad $\rho 1$, son modificados por proteína-quinasas, se utilizó un programa de computación que permitió identificar siete residuos que llenan el consenso para ser fosforilados por la PKC y existe la posibilidad de que estos puedan estar involucrados en la desensibilización del receptor. El tema de la potencial fosforilación del receptor $\rho 1$ se abordará con más detalle en subsecuentes capítulos.

1.3.2 Elementos Estructurales del Receptor y su Papel en la Desensibilización.

Los tres miembros de la familia de receptores GABA_C se caracterizan por presentar una baja tasa de desensibilización (Polenzani *et al*, 1991), y esta propiedad es compartida por las respuestas electrofisiológicas a GABA registradas, ya sea directamente en la retina de diversas especies de vertebrados ó en oocitos de *Xenopus* inyectados con RNAm de retina bovina (Enz y Cutting 1998; Johnston *et al*, 1996; Polenzani *et al*, 1991). La excepción a esta característica son los registros electrofisiológicos de células bipolares de la retina de la carpa, en los cuales pese a que las corrientes no son bloqueadas por bicuculina (característica típica de los receptores GABA_C), éstas decaen como las de los receptores tipo GABA_A (Han *et al*, 1997). Sin embargo, el hecho de que todos los receptores GABA_C conservan la propiedad de no desensibilización a lo largo de la escala filogenética, así como entre los diferentes miembros de la familia génica, indica que esta característica debe jugar un papel fisiológico muy importante para este receptor y por ende para las funciones de la retina y del cerebro.

Algunas mutaciones puntuales del canal iónico de algunos receptores son capaces de alterar la cinética de los receptores ionotrópicos, mediante cambios en la tasa de

Algunas mutaciones puntuales del canal iónico de algunos receptores son capaces de alterar la cinética de los receptores ionotrópicos, mediante cambios en la tasa de desensibilización. Este tipo de cambios fueron encontrados inicialmente en la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico (Revah *et al*, 1991) y recientemente en la subunidad $\alpha 6$ del receptor GABA_A (Im *et al*, 1995). En ambos casos, residuos de leucina que son conservados filogenéticamente en este dominio fueron modificados por mutaciones *in vitro* y estos cambios alteraron la cinética de desensibilización de los receptores.

1.4 EL OOCITO DE *Xenopus laevis* COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIAR NEURORECEPTORES Y CANALES IONICOS.

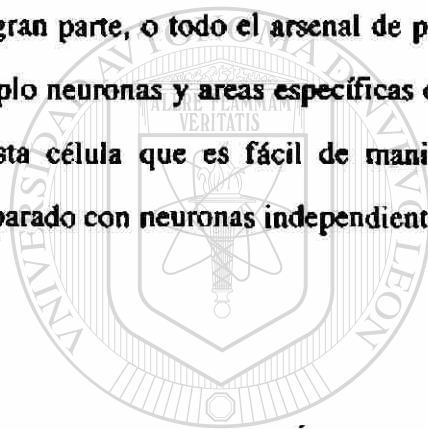
1.4.1 Generalidades del Oocito de *Xenopus laevis*.

Los oocitos de *Xenopus* que son utilizados para la caracterización funcional de canales iónicos y neuroreceptores son células inmaduras cuyo ciclo celular está interrumpido en la profase meiótica I (Dumont 1972). El desarrollo de estos oocitos se dividen en varios estadios (I-VI) y los que generalmente son empleados para estudios electrofisiológicos se encuentran en los estados V y VI. Estos oocitos miden aproximadamente entre 1 y 1.5 mm de diámetro y están divididos en dos hemisferios: el vegetal que es de coloración amarillenta y el animal que es oscuro y es hacia donde se localiza el núcleo o vesícula germinal.

Los oocitos se pueden aislar fácilmente del ovario usando pinzas de punta fina. Una vez separados, éstos se encuentran rodeados por cubiertas de células (foliculares y epiteliales) y otras fibras de soporte (cubierta vitelina) y tejido conectivo (teca). Estas cubiertas protegen al oocito de daño mecánico y aportan diversos factores para su desarrollo (Dumont 1972, Miledi *et al*, 1989).

1.4.2 Los Oocitos de *Xenopus* Traducen RNAm Heterólogo.

Cuando los oocitos son inyectados con RNAs, proveniente de otro tejido o tipo celular (por ejemplo del cerebro o retina), la maquinaria traduccional del oocito reconoce a los mensajeros exógenos y sintetiza las proteínas codificadas en éstos. De este modo, los RNAs inyectados codifican para las proteínas sintetizadas en el tejido del cual se extrajo originalmente, entre estas proteínas estarán los canales iónicos y receptores, los cuales, al ser insertados en la membrana del oocito pueden ser fácilmente estudiados por métodos electrofisiológicos (Gundersen *et al*, 1983a,b; Gundersen *et al*, 1984a,b,c; Sumikawa *et al*, 1984). De este modo, una gran parte, o todo el arsenal de proteínas sintetizadas en un tipo celular o tejido, como por ejemplo neuronas y áreas específicas del cerebro, puede ser 'transplantado' al oocito y estudiado en esta célula que es fácil de manipular, accesible y bastante resistente al daño mecánico comparado con neuronas independientes mantenidas en cultivo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.5 JUSTIFICACION

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central y el estudio de sus receptores contribuirá a entender mejor los principios normales y patológicos de la transmisión sináptica que ocurre en el cerebro y en la retina. Ello dará una mejor panorámica de las características moleculares y funcionales de la transmisión sináptica, la cual es la base de las funciones del cerebro.

1.6 OBJETIVO GENERAL

Estudiar algunas de las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los receptores GABA_C y de las isoformas de su subunidad $\rho 1$.

1.7 OBJETIVOS PARTICULARES

I. Aislar a partir de bancos de DNAc de retinas humanas los DNAc de las supuestas isoformas de la subunidad GABA $\rho 1$ y determinar su secuencia nucleotídica.

II. Analizar las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de las isoformas de GABA $\rho 1$ en el modelo de los oocitos de *Xenopus laevis*.

III. Determinar la distribución de las subunidades de los receptores GABA_C y de sus isoformas en el SNC.

IV. Determinar si la fosforilación del receptor GABA $\rho 1$ por la proteína-cinasa C (PKC) está involucrada en la baja tasa de desensibilización del receptor.

V. Determinar el posible papel del segundo dominio transmembranal en el mecanismo de no desensibilización.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 Origen de los reactivos

Los estuches para transcripción *in vitro* fueron adquiridos de Promega (Madison, WI, EUA); el estuche para el radiomarcaje de sondas de DNA de Gibco-BRL (Rockville, MD, EUA); el estuche para la síntesis de sondas biotiniladas y detección de hibridaciones *in situ* de Boehringer (Indianapolis, IN, EUA); el estuche para la construcción de bibliotecas de DNAC en el bacteriófago λ -ZAP de Stratagene (La Jolla, CA, EUA); el estuche para la construcción y aislamiento de proteínas en fusión con el plásmido pMAL-c2 de New England Biolobas (Bethesda, MD EUA); el estuche para reacciones de RT-PCR de Boehringer; para la determinación de la secuencia nucleotídica por el método de Sanger se utilizó el estuche de USB/Amersham.

Las enzimas Taq polimersa, fosfatasa alcalina, DNA polimerasa (fragmento de Klenow) y enzimas de restricción fueron adquiridas de Gibco, BRL; la enzima Pfu de Stratagene.

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR fueron sintetizados por la compañía Genosys (San Francisco, CA, EUA).

Todo el material de plástico y vidrio (tubos, pipetas, puntas para pipeta, etc. se adquirieron de la casa comercial Falcon (distribuidor en Irvine, CA).

2.2 MATERIAL BIOLÓGICO Y EQUIPO.

Material biológico. Las células de *E coli* se adquirieron de las siguientes compañías: DH5 α (Gibco, BRL), XL1blue (Stratagene), K802 (ATCC), TB1 (New England Biolabs).

Las ranas del género *Xenopus* se adquirieron de Nasco (Madison, WI, EUA) y *Xenopus* 1 (Dexter, MI, EUA).

Las ratas empleadas para la hibridación *in situ* y para la colección de tejido para aislamiento de RNA se adquirieron de Charlie River Co. (Boston, MA).

El tejido de cerebro y retinas de bovino se obtuvo del rastro Shamrock Co. (Downey, CA, EUA).

Equipo. Se utilizó la centrifugó de alta capacidad Beckman J221 (Fullerton, CA) con el rotor TJI4. La microcentrífuga Eppendorf 5402 (Hamburgo, Alemania). Cámaras de electroforesis para minigeles horizontales, geles verticales en placa y para secuenciación de DNA de Gibco. Termociclador Perkin-Elmer 9000. Se utilizó un microscopio confocal diseñado y construido por el Dr. Ian Parker (Universidad de California, Irvine). Equipo de trampa de voltaje de Axoclamp (New Port Beach, CA) y una computadora PC para adquisición de datos.

2.3 CLONACION Y ESTUDIOS FUNCIONALES Y DE DISTRIBUCION DE FORMAS ALTERNATIVAS DE LA SUBUNIDAD $\rho 1$.

2.3.1 Tamizaje de Bibliotecas de DNAC de Retina.

Dos bibliotecas de DNAC de retinas humanas adultas y fetales construídas en el fago λ gt11 y en el charon BS⁺ (Swaroop y Waissmann, 1988) fueron donadas por A. Swaroop y J. Nathans (Johns Hopkins University). Se adquirió la cepa de *E coli* (K802) de ATCC (Rockville, MD, EUA), la cual se utilizó para propagar estas bibliotecas.

Después de dos tamizajes donde se utilizaron métodos convencionales de propagación e hibridación con sondas de DNA homólogo (Sambrook *et al*, 1989), y en los que no se obtuvieron clonas positivas (muy posiblemente debido a la baja cantidad de transcritos para estos receptores), se decidió emplear una estrategia alterna que permitiera enriquecer la cantidad de clonas menos abundantes mediante la construcción de sub-bibliotecas, y el tamizaje de éstas por PCR (Lardelli y Lendahl 1994).

2.3.2 Propagación de la Biblioteca de DNAC y Transformación de Bacterias.

Se propagó *E. coli* K802 en placas de LB-Agar suplementado con 0.2% maltosa y se incubó a 37°C por 14-16 h. Una sola colonia de esta placa se transfirió a un matraz con 20 ml de medio NZCYM (1g de NZ-amina, 1 g de casa-aminoácidos, 1 g de extracto de levadura y 1 g de MgSO₄·7H₂O en 100 ml de H₂O) suplementado con 0.2% de maltosa, se incubó a 37°C con agitación continua (230 rpm) por 12-14 h. La absorbancia óptica del cultivo se determinó a λ 600 nm y se ajustó con NZCYM suplementado con 0.2% de maltosa para obtener 20 ml de bacterias a una concentración de 0.4 unidades ópticas (a una λ de 600 nm).

Una vez ajustada la concentración, se infectó el inóculo de bacterias con 1 millón de unidades formadoras de placa (ufp) de una de las bibliotecas de DNAC. Se incubó a 37°C por 15 min y se dividió inmediatamente en 20 tubos (Falcon de 15 ml) cada uno con 1 ml del inóculo original. Estos se incubaron a 37°C por 3 h y el crecimiento se detuvo al agregar 3-4 gotas de cloroformo. Se centrifugó cada tubo a 9800 g en un rotor de ángulo fijo (TJ14) por 10 min a 4°C. Los sobrenadantes (los cuales contenían las partículas virales) se transfirieron a tubos nuevos y se guardaron a 4°C. La eficiencia de transformación de estos sobrenadantes bajó considerablemente después de 2-3 semanas, pese a que después de este tiempo las señales obtenidas por PCR se mantuvieron. Esta eficiencia fluctuó originalmente entre un rango de 4 a 8 $\times 10^9$ ufp/ μ l.

2.3.3. Tamizaje Molecular.

De cada sobrenadante se obtuvieron 2 μ l que sirvieron como templado para realizar veinte reacciones de PCR. Se realizaron dos series de reacciones utilizando cuatro diferentes oligonucleótidos (Fig. 5). La primer reacción fué dirigida a amplificar la región del amino terminal del DNAc que codifica para p1 y empleó a los oligonucleótidos 1=5'-ATGAGATTTGGCATCTTTCTT-3' y 2= 5'-GGCAGGGCC TCCGAAGCCAGG-3', mientras que la segunda reacción se centró en el extremo que codifica para el carboxilo terminal del receptor empleando los oligonucleótidos 3= 5'-GTGTTCTCTCGGTGCTG3'- y 4= 5'-GGAGAAAAT AGACCAGTATAT-3', para ambas PCRs se utilizó el siguiente programa: 94°C 3 min, 35 ciclos de 94°C 40 s, 50°C 40 s y 72°C 40 s.

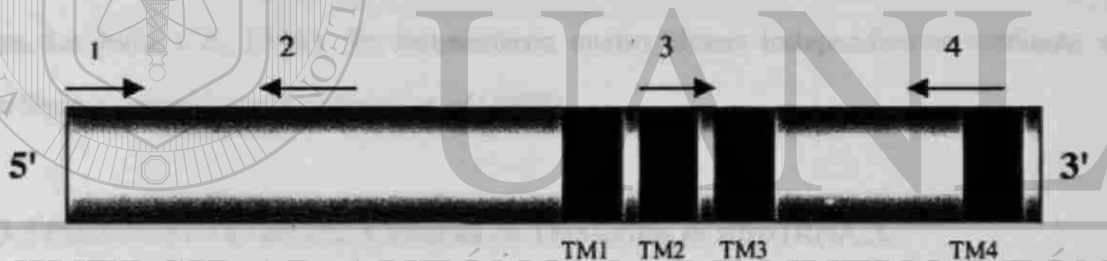


Figura 5. Posición de los oligonucleótidos utilizados en la PCR. “Primers” 1 y 2 amplifican un fragmento de 247 pb mientras que 3 y 4 amplifican 100 pb. La posición de los cuatro segmentos transmembranales es señalada como TM1-TM4.

2.3.4. Re-propagación.

Los sobrenadantes que dieron señales positivas por PCR se utilizaron para infectar con 5×10^4 ufp a la cepa de *E. coli* K802 y sembrar las bacterias infectadas en dos placas. Se incubó por 5-8 h ó hasta que las placas de lisis pudieran distinguirse claramente, pero sin que alcanzaran a fusionarse. Las placas se incubaron a 4°C por no menos de dos h. Cada placa se transfirió a

filtros de nylon y las clonas positivas se identificaron por hibridación homóloga en amortiguador de hibridación (Formamida 50%, 5X SSPE, 1X solution de Denhardt, SDS 0.1%) y con lavados en condiciones de alta exigencia (dos lavados de 15 min con SSC5X y SDS 0.5% a temperatura ambiente, dos lavados de 15 min con SSC 1X y SDS 0.5% a 37 °C y finalmente tres lavados con 0.1X SSC y 1% SDS a 65°C). Como sonda se utilizó el DNAc de p1 radiomarcado (con ³²P). De estos tamizajes se obtuvieron clonas correspondientes a p1, p1Δ51 y p1Δ450.

Cada clona positiva se propagó independientemente en 50 ml de LB suplementado con 0.2% de maltosa y se extrajo el DNA de cada una (Sambrook *et al*, 1989). Este DNA se cortó con *EcoRI* para liberar el fragmento correspondiente al DNAc. Debido a que el DNAc de p1 contiene un sitio *EcoRI* interno, fue necesario realizar un corte parcial. La banda de peso molecular aproximado a 2 Kb se aisló y se subclonó en el sitio *EcoRI* del plásmido pBSKS (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Se secuenciaron cuatro clonas independientes mediante el método de Sanger descrito por Sambrook *et al* (1989).

2.3.5 Plásmidos de Expresión y Síntesis de Transcritos *in vitro* (RNAc).

10 µg de cada clona seleccionada en pBSKS fueron linearizados con la enzima de restricción *SalI* para la producción de un RNAc con sentido y con *NotI* para la producción del antisentido. Los plásmidos linearizados se “limpiaron” mediante dos extracciones con fenol-cloroformo, se precipitaron con acetato de amonio 7.5 M y etanol absoluto y se centrifugaron por 30 min, la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% y finalmente se secó en un evaporador centrífugo con vacío.

Para la síntesis de RNAc (la cual se realizó con todos los componentes libres de RNAsas), el plásmido linearizado se resuspendió en agua y los componentes fueron agregados en

el siguiente orden: rNTPs (concentración final de 10 mM), DTT 100 mM, CAP (7-metil guanosina) (0.3 mM final) y 5U de la enzima RNA polimerasa de T7 (sentido) o la RNA polimerasa de T3 (antisentido).

Como una alternativa, para incrementar los niveles de expresión de los receptores, se transfirieron los DNACs de $\rho 1$, $\rho 1\Delta 51$ y $\rho 1\Delta 450$ al plásmido pSP64T (Krieg y Melton 1984), linearizado con *Bgl*III, "rellenado" en los extremos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* y desfosforilado con la fosfatasa alcalina de intestino de ternera. Para producir el RNAC, el plásmido fue linearizado con *Sal*I y el transcrito producido con la RNA polimerasa de SP6 (Fig. 6).

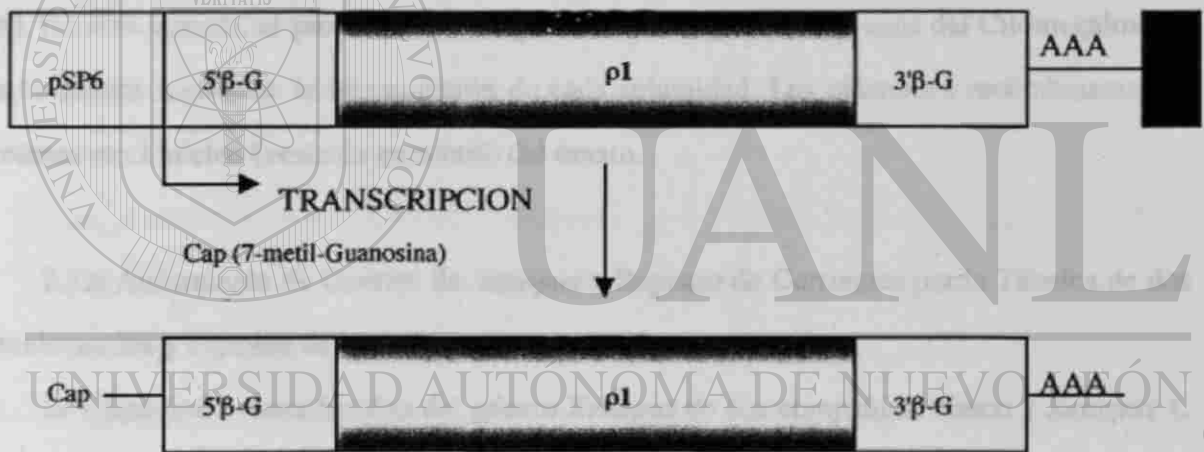


Figura 6. Mapa funcional del plásmido pSP64T- $\rho 1$. El DNAC de $\rho 1$ fue insertado en el sitio *Bgl*III del plásmido pSP64T (Krieg y Melton, 1984), de tal manera que la transcripción está regulada por el promotor del fago SP6. En los extremos 5' y 3' de la región codificante para el receptor, se localizan las regiones no traducibles del gen de la β -globina (β -G) de *Xenopus* y en el extremo distal 3' se localiza una secuencia de poliadeninas. El nucleótido metilado (7 metil-Guanosina) que forma el "capuchón" (Cap) del transcrito es añadido por la RNA polimerasa durante la reacción de transcripción *in vitro*.

Después de 3 h de incubación a 37°C el DNA plasmídico se eliminó con 1 U de DNAsa (RQ1) (Promega, Madison, WI, EUA) por 15 min a 37°C. La solución se limpió con un volumen de fenol-cloroformo y el sobrenadante, que contiene el RNAc, se precipitó con acetato de amonio y etanol, se centrifugó por 30 min y finalmente se lavó con 1 ml de etanol al 70%. La pastilla final se secó al vacío y se resuspendió en 10 µl de agua estéril y libre de RNAsa. El RNAc se cuantificó en el espectrofotómetro y se ajustó a una concentración de 1 µg/µl. Este RNAc se conservó congelado a -70°C hasta su uso.

En una tercer alternativa de expresión, se subclonaron los DNAs de p1, p1Δ51 y p1Δ450 en el plásmido de expresión eucariótica pcDNA3 (Invitrogen, La Jolla, CA, EUA). De esta manera, el promotor transcripcional de los genes tempranos del Citomegalovirus humano estaría regulando la transcripción de cada subunidad. Los plásmidos recombinantes se inyectaron en el núcleo (vesícula germinal) del oocito.

2.3.6 Aislamiento de Oocitos de *Xenopus* y Registro de Corrientes por la Técnica de dos Microelectrodos y Fijación de Voltaje.

Se adquirieron ranas hembra del género *Xenopus* de dos compañías: Nasco y *Xenopus* 1. Estas se anestesiaron por hipotermia y se decapitaron con guillotina. Los ovarios se removieron usando tijeras y se colocaron en cajas Petri con medio de Barth modificado (88 mM de NaCl, 1 mM de KCl, 2.4 mM de NaHCO₃, 0.82 mM de MgSO₄, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.42 mM de CaCl₂, y 5 mM de HEPES, pH 7.4). El medio fue suplementado con el antibiótico gentamicina a 0.1 mg/ml. Para remover las células foliculares que rodean al oocito, se trataron los folículos con colagenasa (0.5 mg/ml) disuelta en medio de Ringer por 40 min a temperatura ambiente.

Los oocitos se aislaron individualmente con pinzas de punta fina y se incubaron a 16°C por 24 h. Los oocitos se inyectaron a presión con un microinyector usando microagujas homeadas para eliminar cualquier contaminación con RNAsas. Se inyectaron 50 nl de RNAc (1 µg/µl) en el polo vegetal del oocito ó 10 nl de plásmido (1 µg/µl) en el núcleo. Varios días después, las corrientes eléctricas generadas por la aplicación de GABA y otros agonistas o antagonistas se registraron utilizando el método de los dos microelectrodos y fijación de voltaje que se ha empleado ya para la caracterización de otros receptores y canales iónicos (Gundersen *et al*, 1983a,b, 1984a,b, Miledi *et al*, 1982).

Los registros de las corrientes obtenidas fueron almacenadas en una computadora. Para el registro de las corrientes se utilizó el programa Nicolet (diseñado y hecho por Rico Miledi), y para el análisis se empleó el programa comercial Micrococcal Origin (Northampton, MA, EUA).

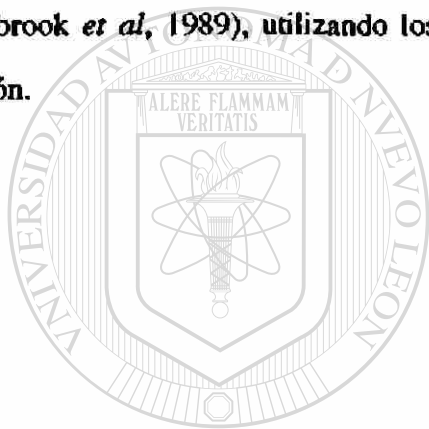
2.3.7 Construcción de Receptores en Fusión con la Proteína Verde Fluorescente (GFP).

La GFP exhibe una fuerte señal fluorescente cuando es excitada a ciertas longitudes de onda (alrededor de 480 nm). Esta propiedad la ha convertido en un marcador casi ideal en sistemas de expresión heterólogos, ya que permite observar su expresión en tiempo real, así como determinar su localización subcelular y, debido a que no se tiene que fijar la célula que la expresa, permite analizar el tráfico intracelular de proteínas *in vivo* (Chalfie *et al*, 1994). Para estudiar si el DNAc de $\rho\Delta 450$ es capaz de formar RNAm traducible a proteína y de ser anclado en la membrana plasmática, se construyeron dos genes de fusión. Uno entre $\rho 1$ y GFP (el cual se usó como control positivo de expresión) y otro entre $\rho\Delta 450$ y GFP. Se diseñó una estrategia de clonación que permitió la fusión en el marco de lectura adecuado, de tal manera que GFP se fusionó al extremo carboxilo de $\rho 1$ o de $\rho\Delta 450$ (Fig. 7). Por tanto, el péptido líder (el cual permite la incorporación de la proteína a la membrana plasmática) fue donado por el receptor.

Los plásmidos se inyectaron en el núcleo del oocito y las corrientes generadas se estudiaron usando la configuración de fijación de voltaje. Finalmente, los oocitos fueron estudiados bajo un microscopio confocal de fluorescencia.

2.3.8 Tamizaje de las isoformas del receptor $\rho 1$ en el SNC bovino.

Se aisló RNA de varias áreas del sistema nervioso central (utilizando la técnica de Chomczynski y Sacchi, 1987) incluyendo cerebelo, hipocampo, amígdala, cuerpo caloso, nervio óptico y retina. Este RNA sirvió de templado para reacciones de retrotranscripción-PCR (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando los oligonucleótidos 1 y 2 descritos anteriormente en esta sección.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

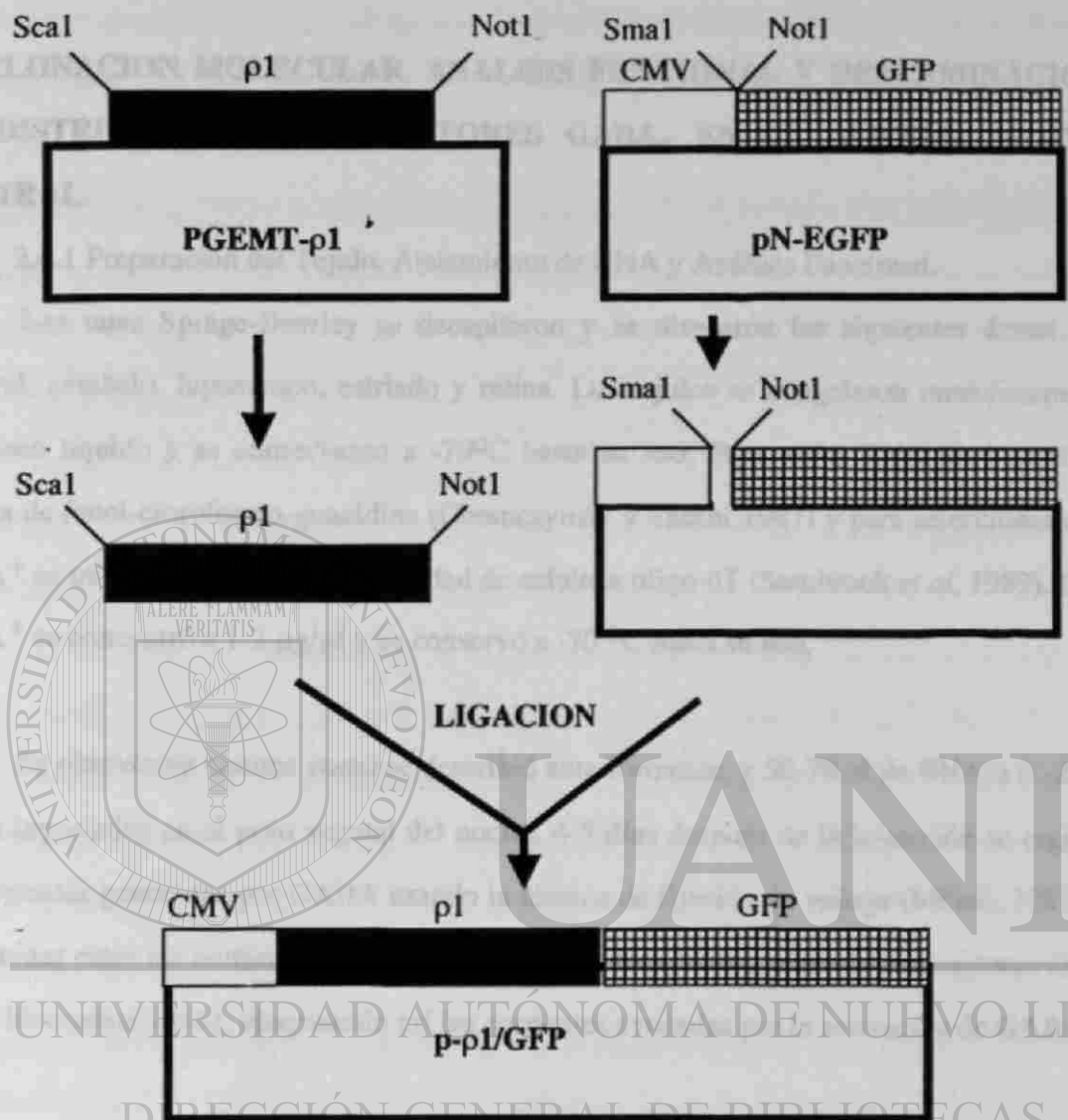


Figura 7. Estrategia de construcción del plásmido de expresión de la quimera ρ1-GFP. El primer paso consistió en modificar por mutación *in vitro* el DNAc de ρ1 de tal manera que se removió el codón de terminación traduccional y se introdujo un sitio *NotI*. El plásmido que contiene el DNAc modificado (pGEMT-ρ1) fue cortado con *ScaI* y *NotI* para liberar el fragmento correspondiente al DNAc de ρ1. Este fragmento fue clonado en el plásmido pN-EGFP, previamente cortado con *SmaI* y *NotI*. El plásmido resultante (p-ρ1/GFP) se usó para inyectarlo en el núcleo de oocitos de *Xenopus*.

2.4 CLONACION MOLECULAR, ANALISIS FUNCIONAL Y DETERMINACION DE LA DISTRIBUCION DE RECEPTORES GABA_C EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

2.4.1 Preparación del Tejido, Aislamiento de RNA y Análisis Funcional.

Las ratas Sprague-Dowley se decapitaron y se disecaron las siguientes áreas: corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, estriado y retina. Los tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C hasta su uso. Para aislar RNA total se siguió la técnica de fenol-cloroformo-guanidina (Chomczynski y Sacchi 1987) y para seleccionar el RNA Poli-A⁺ se utilizó una columna de afinidad de celulosa oligo-dT (Sambrook *et al*, 1989). El RNA Poli-A⁺ se concentró a 1-2 µg/µl y se conservó a -70 °C hasta su uso.

Se obtuvieron oocitos como se describió anteriormente, y 50-70 nl de RNAm (1-2 µg/µl) fueron inyectados en el polo vegetal del oocito. 4-5 días después de la inyección se registraron las corrientes generadas por GABA usando la técnica de fijación de voltaje (Miledi, 1982). Para discriminar entre las corrientes generadas por el receptor GABA_A y posibles receptores GABA_C, se usó bicuculina 1 mM, bloqueando así las corrientes evocadas por la activación de GABA_A.

2.4.2 Análisis por RT-PCR.

El RNA aislado de las diferentes regiones del cerebro se usó como templado para sintetizar el DNAc, utilizando la Transcriptasa Reversa de MMLV (Gibco, MD, EUA) y dos oligonucleótidos degenerados con homología a las secuencias conservadas de los receptores GABA_C. Los oligonucleótidos empleados fueron: 5'-YTTYGTBCATTCYAAAMGVTCM3-' y 5'-ACWGTGGAGAGGTARTTSACRG-3' (donde B=G+T+C, R=A+G, S=G+C, M=A+C, V=G+A+C, W=A+T, Y=C+T). La retrotranscripción constó de un paso a 50°C por 40 min con el oligonucleótido B y el programa de amplificación fue de 94°C por 1 min y treinta ciclos de

El producto de amplificación del tamaño esperado (aproximadamente 600 pb) se resolvió en geles de agarosa al 1%, la banda de interés se aisló por absorción a sílica y se ligó al vector pGEM-T (Promega, Madison WI, EUA). Los productos de ligación se utilizaron para transformar *E. coli* (DH5 α o XL1-blue) y se determinó la secuencia nucleotídica por el método de Sanger (Sambrook et al 1989).

2.4.3 Hibridación *in situ*.

Debido a que las señales obtenidas por RT-PCR fueron más abundantes en cerebelo que en cualquier otra área (a excepción de la retina), se decidió determinar por hibridación *in situ* la distribución de las tres diferentes subunidades tipo ρ .

Se sacrificaron ratas hembra y se decapitaron inmediatamente. Se disecó el cerebelo y se fijó en glutaraldehído al 4% por 24 h y se prepararon cortes horizontales de 20 μ m utilizando un crióstato. Los cortes se prehibridaron a 37°C y se hibridaron por separado con ribo-sondas sentido y antisentido específicas de los receptores $\rho 1$ - $\rho 3$. El buffer de hibridación consistió en: SSC 4X, dextran sulfato al 10%, EDTA a 2 mM, 50% formamida y 500 μ g/ml de DNA de esperma de salmón. Cada sonda se marcó con rUTP-Biotina mediante la síntesis de RNAc *in vitro*. Se realizaron lavados de alta exigencia y se hizo la detección con anticuerpo anti-biotina ligado a la enzima fosfatasa alcalina. El revelado se llevó a cabo usando NBT y BCIP. Cada corte se analizó al microscopio de luz y se fotografió.

2.4.4 Construcción y Tamizaje de Una biblioteca de DNAc de Cerebelo Bovino.

Se obtuvieron tres cerebros completos de vaca adulta y se les disecó el cerebelo. Se aisló el RNA total (Chomczynski y Sacchi 1987) y se seleccionó el RNAm por cromatografía de afinidad a oligo dT (Sambrook *et al*, 1989). Este RNAm se utilizó como templado para reacciones de RT-PCR que permitieron identificar amplicones con secuencias semejantes a

receptores GABA_C. Este mismo RNAm se utilizó para construir una biblioteca de DNAc en el fago λ-ZAP (Invitrogen, La Jolla CA, EUA). La biblioteca se tamizó utilizando como sondas los fragmentos previamente amplificados por PCR, de las clonas positivas se aisló el DNA y a éste se le determinó su secuencia nucleotídica. Dos de estas clonas resultaron ser semejantes a los receptores ρ1 y ρ2 humanos, con algunas diferencias puntuales. Para lograr expresar estos DNacs en oocitos de *Xenopus*, la región codificante se clonó en el vector pSP64T (Krieg y Melton 1984) y con el plásmido quimérico resultante se sintetizó el RNAc que se inyectó en el citoplasma del oocito. Posteriormente, se estudiaron las características de los receptores generados mediante la técnica de fijación de voltaje (Miledi, 1982).

2.4.5 Tamizaje de una Biblioteca de DNAc de Cerebro de Rata.

Con el fin de encontrar nuevos genes relacionados a los receptores GABA_C en el sistema nervioso, se tamizó una biblioteca de DNAc de cerebro de rata (Invitrogen La Jolla CA, EUA), usando como sondas a los productos de amplificación de la PCR mostrados en la figura 15 de la sección de resultados, usando condiciones de baja exigencia durante el proceso de hibridación (Sambrook *et al*, 1989). Las clonas positivas fueron aisladas, secuenciadas y subclonadas en los vectores de expresión pSP64T (Krieg y Melton 1984) y pcDNA3.

2.5 MUTACIONES EN LOS SITIOS DE FOSFORILACION DEL RECEPTOR ρ1

Y CO-EXPRESION CON RECEPTORES ASOCIADOS A PROTEINAS G

2.5.1 Mutaciones Dirigidas

El receptor ρ1 tiene siete sitios que pueden ser potencialmente fosforilados por proteína cinasas y tres de ellos (Ser 425, Ser 434 y Ser 441) se encuentran en la región de la segunda asa intracelular. Estos últimos fueron elegidos para modificarse *in vitro* porque están en contacto directo con el citoplasma, que es donde se encuentran las cinasas.

Los codones que codifican para estos residuos fueron cambiados por codones de alanina, utilizando oligonucleótidos sintéticos en la técnica de mutación por PCR en dos etapas (Picard et al, 1994). La primera reacción de PCR se realizó con el primer A=5'-CTCCTTCATCCACGACAC-3' en combinación con uno de los tres oligonucleótidos mutagénicos SER425=5'-GACCCTGGCCGCAGAGAGGA-3'; SER434=5'-ACAGAGGAAAGCTCAGAGAAGC-3' y SER441=5'-CAGCTATGTGGCCATGAGAATC-3', utilizando un programa de amplificación con 25 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 1 min. Los productos amplificados (que portaban los fragmentos mutados) se resolvieron en geles de agarosa al 1% y se aisló la banda del peso molecular adecuado. Una vez aislados, cada fragmento se utilizó como "megaprimer" en reacciones de amplificación "asimétrica" utilizando 15 ciclos de 94 °C por 40 s y 72°C por 2 min. Finalmente, para extender la cadena de DNA hasta el extremo terminal de la región codificante de p1 se añadió a la reacción de PCR el "primer" B=5'-TACAGTTATTTCTGTAGT-3' y se utilizó el siguiente programa: 94°C 30 s, 55°C 30 s 72°C 1 min por 25 ciclos. Las reacciones de PCR se fraccionaron en geles de agarosa al 1% y los productos de alrededor de 1 Kb se aislaron y se digirieron con las enzimas *Bgl*II y *Sac*I. El fragmento *Bgl*II-*Sac*I se introdujo en el plásmido pAV111 (Calvo et al, 1994), el cual porta el DNAc del receptor p1 silvestre, con lo cual se introdujo cada mutación en construcciones independientes. Finalmente, para construir el triple mutante, se combinaron los fragmentos mutados en la primera reacción en una sola reacción de re-amplificación, lo que dió lugar a combinaciones de dobles y triples mutaciones.

Los cambios ó mutaciones introducidas fueron corroborados determinando la secuencia de los genes mutados (Sambrook et al, 1989). El triple mutante ($\rho 1_{(S425,434,441A)}$) se expresó en oocitos de *Xenopus* y sus propiedades se estudiaron por la técnica de los dos microelectrodos y fijación de voltaje (Miledi 1982).

2.5.2 Co-expresión de Receptores de Angiotensina (AT1) y $\rho 1$

Los plásmidos portando los DNAs de los receptores AT1 o $\rho 1$ se linearizaron con *Sall*. Los RNAs de AT1 y $\rho 1$ se sintetizaron *in vitro* utilizando la RNA polimerasa de T7 y se co-inyectaron en oocitos de rana. Las corrientes generadas por la activación de los receptores se determinaron mediante fijación de voltaje. $\rho 1$ fue activado primero, hasta que alcanzó un nivel estable en sus respuestas. AT1 se activó luego con 0.1M ATIII y el efecto de esta activación sobre las corrientes generadas por el receptor $\rho 1$ se midió a los 5, 10, 20, 30 y 40 min. Este estudio se realizó también con el receptor mutante $\rho 1_{(S421,434,441A)}$.

2.5.3 Expresión de la Segunda Asa Intracelular de $\rho 1$ en *E. coli* y Fosforilación *in vitro*

La figura 8 muestra esquemáticamente la estrategia de clonación seguida para la construcción de un plásmido de expresión bacteriana. Se amplificó mediante PCR la región que codifica para la segunda asa intracelular del receptor $\rho 1$ y el amplicón se cortó con las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Pst*1 y se introdujo en el vector de expresión pMALc2 (cortado con *Bam*H1 y *Pst*1). La secuencia nucleotídica de la construcción final se corroboró utilizando el método de secuenciación de Sanger (Sambrook *et al.*, 1989). pMALc2- $\rho 1$ se introdujo en la cepa TB1 de *E. coli* y la inducción de la expresión se llevó a cabo en matraces con medio LB suplementado con 0.1 mM IPTG, añadido en la fase temprana del crecimiento (0.4 DO determinada en un espectrofotómetro a una λ de 600 nm). Las bacterias fueron colectadas por centrifugación 3 h después de la inducción y la proteína recombinante se aisló por cromatografía de afinidad utilizando una resina de amilosa (LaVaille 1987). La proteína purificada se visualizó en geles de poliacrilamida-SDS al 10% teñidos con azul de Coomassie (Sambrook *et al.*, 1987). El mismo proceso se siguió para la proteína control de fosforilación, que fue la segunda asa intracelular de la subunidad $\beta 2$ del receptor GABA_A bovino.

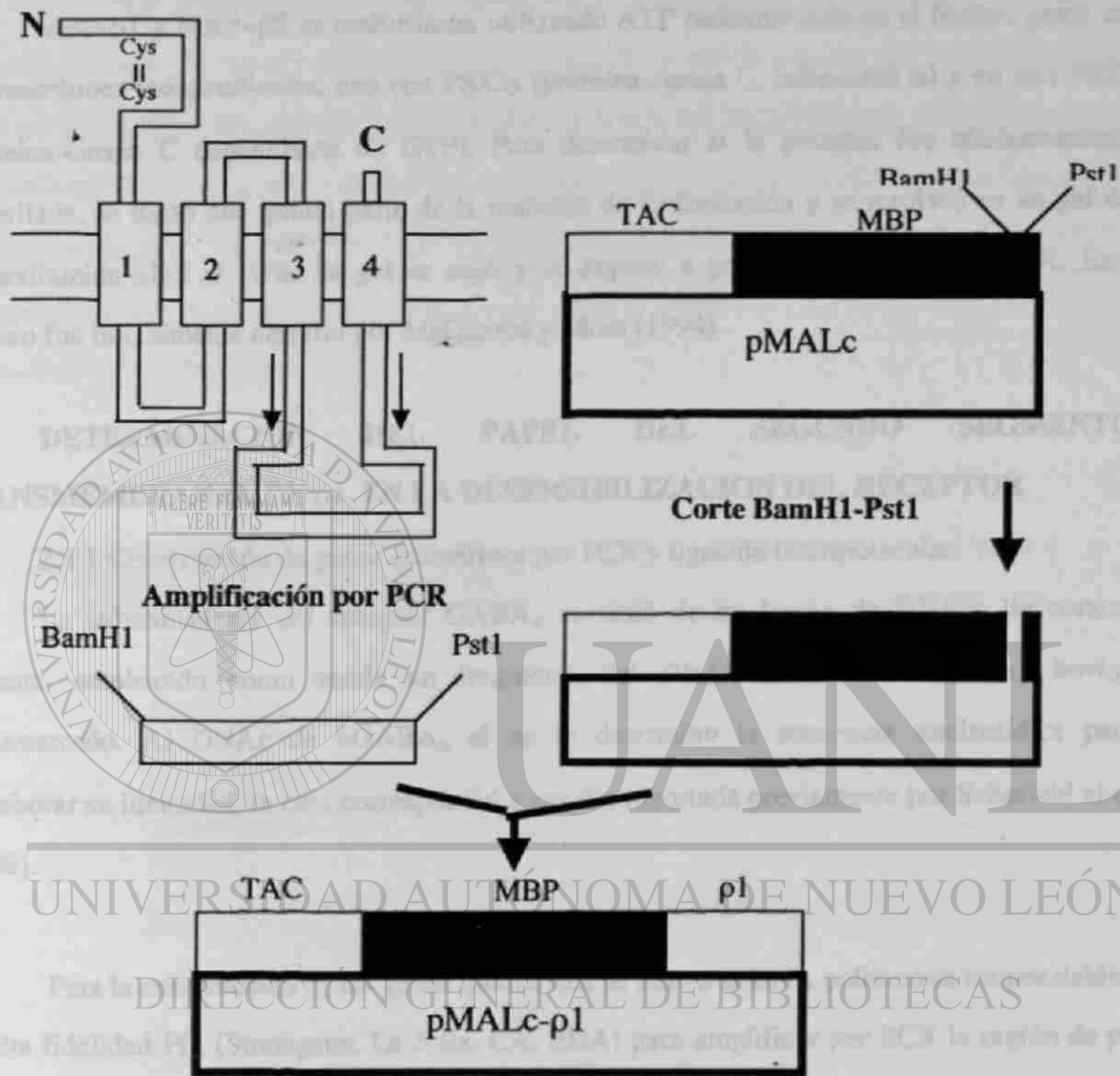


Figura 8. Estrategia para la expresión de la proteína fusión MBP-p1. La región que codifica para la segunda asa intracelular del receptor p1 se amplificó por PCR, lo cual permitió la introducción de un sitio *Bam*H1 en el extremo 5', de un sitio *Pst*I en el extremo 3' y de un codón de terminación. Los sitios de restricción permitieron la clonación en la fase de lectura apropiada del fragmento codificando para la segunda asa intracelular (*Bam*H1-*Pst*I) en el vector pMALc. De este modo se creó el plásmido que permitió la expresión de una proteína fusión (MBP-p1/2ª asa) codificada por un gen fusión bajo el control transcripcional del promotor TAC.

MBP- $\rho 1$ y MBP- $\beta 2$ se fosforilaron utilizando ATP radiomarcado en el fosfato gama en dos reacciones independientes, una con PKC α (proteína-cinasa C, subunidad α) y en otra PKG (proteína-cinasa C dependiente de GTP). Para determinar si la proteína fue eficientemente fosforilada, se tomó una quinta parte de la reacción de fosforilación y se resolvió en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%. El gel se secó y se expuso a película sensible a rayos X. Este método fue inicialmente descrito por McDonald y Moss (1994).

2.6 DETERMINACION DEL PAPEL DEL SEGUNDO SEGMENTO TRANSMEMBRANAL DE $\rho 1$ EN LA DESENSIBILIZACION DEL RECEPTOR

2.6.1 Construcción de genes quiméricos por PCR y ligación intermolecular.

La subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA $_A$ se aisló de un banco de DNACs de corteza humana, empleando como sonda un fragmento del DNAC de la subunidad $\alpha 1$ bovina radiomarcado. Al DNAC de hGABA $_A$ se le determinó la secuencia nucleotídica para corroborar su identidad, la cual correspondió a aquella reportada previamente por Schofield *et al* (1989).

Para la construcción de los genes quiméricos se utilizó la DNA polimerasa termoestable de alta fidelidad Pfu (Stratagene, La Jolla, CA, EUA) para amplificar por PCR la región de $\rho 1$ que abarca desde el codón de iniciación hasta el final de la primer asa intracelular (figura 9). En una segunda reacción se amplificó el segmento de la subunidad $\alpha 1$ desde el inicio del segundo segmento transmembranal hasta el codón de terminación. Los fragmentos amplificados fueron ligados entre sí y clonados en los vectores de expresión pBSKS y pcDNA3. A la quimera así construida se le denominó $\rho 1/\alpha 1$.

Para terminar el "transplante" del segundo segmento transmembranal, se amplificaron por PCR dos regiones (utilizando como templado $\rho 1/\alpha 1$). En la primera reacción se amplificó desde el codón de inicio de la traducción de $\rho 1$ hasta el fin del segundo segmento transmembranal de $\alpha 1$, y en la segunda reacción desde el inicio de la primera asa extracelular de $\rho 1$ hasta el codón de terminación de su traducción. La nueva quimera, a la cual se le denominó $\rho 1_{(\alpha 1/TM2)}$ fue clonada en pBSKS y en pcDNA3. Cada una de las construcciones finales fue microinyectada en oocitos y las corrientes generadas por GABA fueron estudiadas por la técnica de los dos microelectrodos y fijación de voltaje.

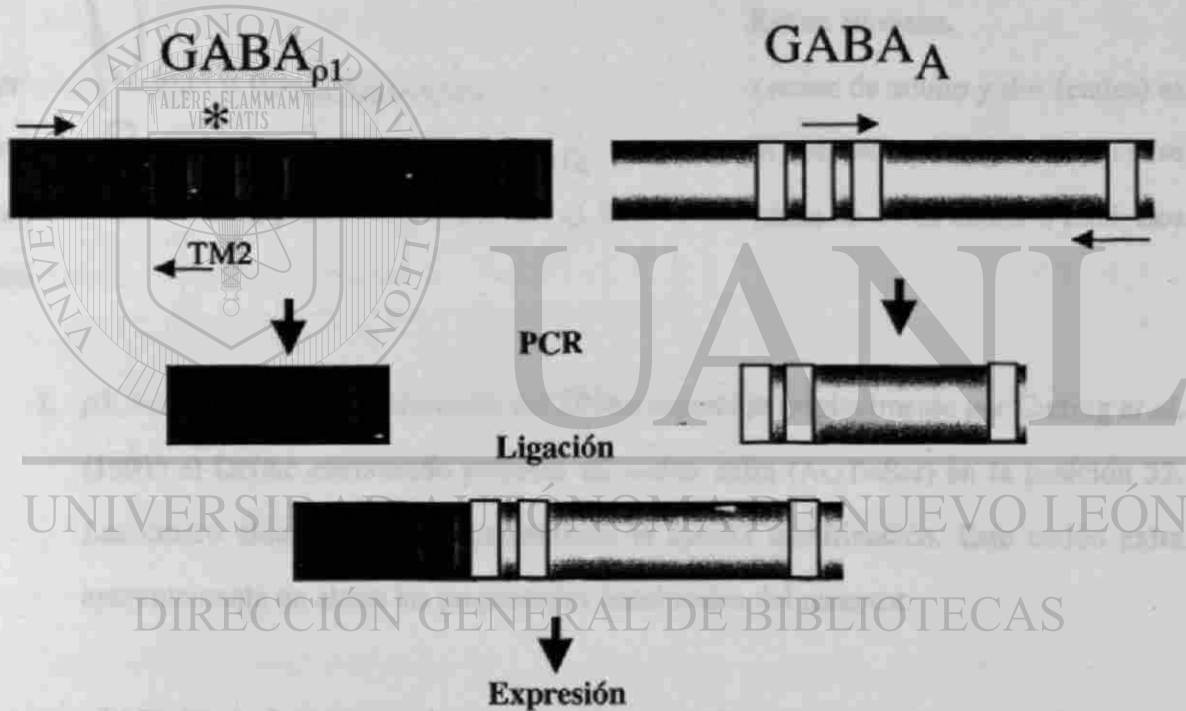


Figura 9. Estrategia para la construcción de genes quimera. Dos reacciones de PCR independientes amplificaron 1) la región corriente arriba de $\rho 1$ y 2) la región 3' de la subunidad $\alpha 1$ de GABA $_A$. Los fragmentos amplificados fueron ligados y subclonados en un vector de expresión.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1. CLONACION MOLECULAR Y EXPRESION FUNCIONAL DE FORMAS ALTERNATIVAS DEL RECEPTOR $\rho 1$

3.1.1 Tres isoformas del Receptor $\rho 1$ se Expresan en la Retina Humana.

De un total de cuatro bancos de DNAC de retina (dos bancos de retina de adulto y dos fetales) se aislaron tres diferentes tipos de clonas que codifican para un receptor $\rho 1$ Fig. 10) y no se encontraron diferencias entre las secuencias de los DNACs obtenidos de retina adulta o fetal. Los tres tipos de clonas corresponden a:

1. $\rho 1$. En este receptor, a diferencia del DNAC reportado originalmente por Cutting *et al*, (1991) el DNAC encontrado presenta un codón extra (AGT=Ser) en la posición 32. Las cuatro clonas obtenidas presentaron la misma modificación. Este codón extra aparentemente no altera las propiedades funcionales del receptor.
2. $\rho 1\Delta 51$. El cual carece de 51 nt, que eliminan 17 aminoácidos en la región amino terminal del receptor que codifica para la región extracelular del mismo. Tanto la secuencia líder, que permite que el receptor sea anclado a la membrana, como los segmentos transmembranales, se conservan intactos en esta isoforma.

3. $\rho 1\Delta 450$. El cual presenta una deleción en la misma región que $\rho 1\Delta 51$, pero se extiende 450 nt hacia el carboxilo terminal. Esta deleción elimina claramente residuos críticos para el funcionamiento y ensamblaje adecuado de un receptor funcional.

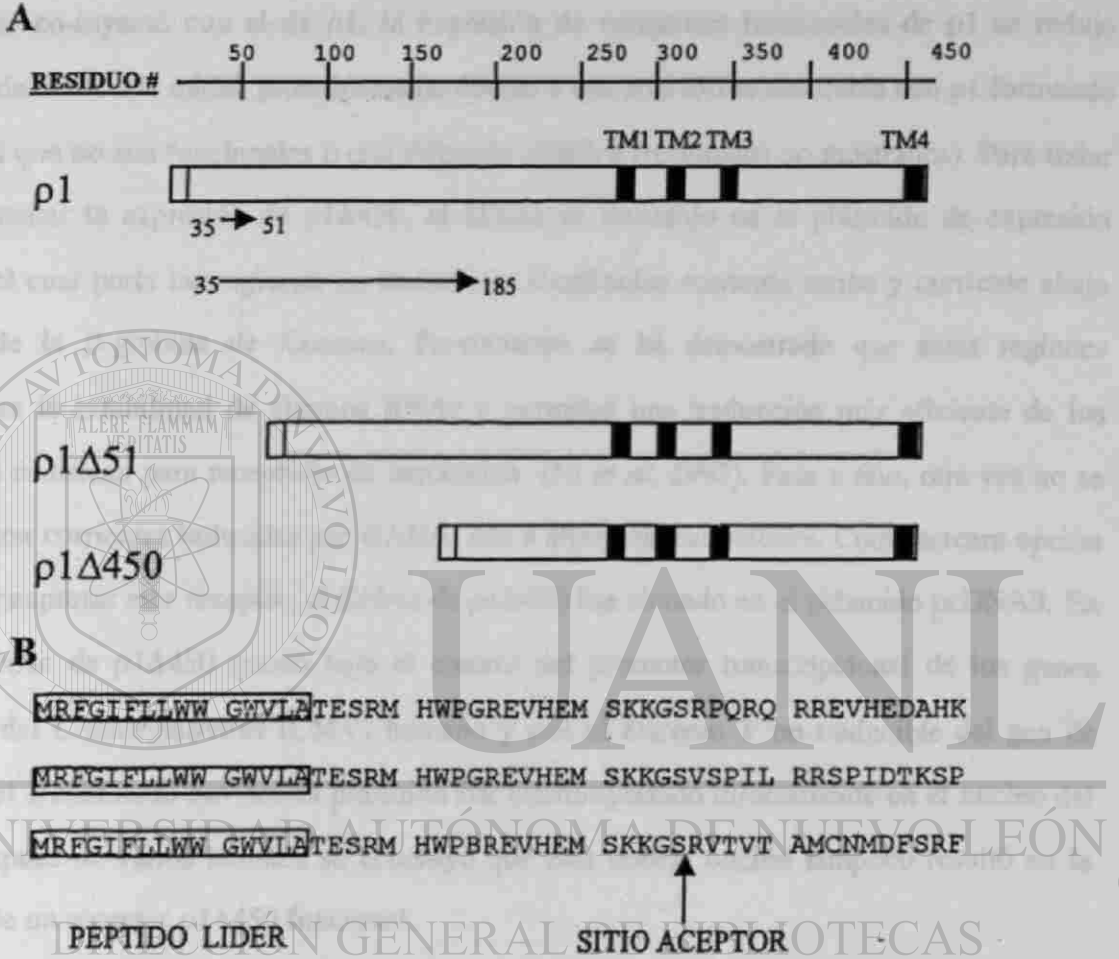


Figura 10. Tres isoformas del receptor $\rho 1$ se expresan en retina humana. **A)** Algunos fragmentos del extremo amino-terminal del receptor $\rho 1$ se remueven por "splicing" alternativo, de manera que se forman transcritos con deleciones de 51 (17 residuos en $\rho 1\Delta 51$) y 450 nt (150 residuos en $\rho 1\Delta 450$). Ambos transcritos tienen un marco de lectura completo. $\rho 1\Delta 51$ no pierde dominios críticos para la formación de un receptor funcional, mientras que $\rho 1\Delta 450$ pierde residuos necesarios para la formación de receptores funcionales. **B)** Supuesta secuencia aminoacídica del extremo amino-terminal de las isoformas de la subunidad $\rho 1$, mostrando la región del péptido líder y el sitio de aceptor del "splicing" alternativo.

3.1.2 Expresión de $\rho 1\Delta 51$ y $\rho 1\Delta 450$ en Oocitos de *Xenopus*.

Después de inyectar oocitos de varios donadores con varias preparaciones de RNAc de $\rho 1\Delta 450$, no se logró detectar ninguna corriente generada por GABA. Cuando el RNAc de $\rho 1\Delta 450$ se co-inyectó con el de $\rho 1$, la expresión de receptores funcionales de $\rho 1$ se redujo aproximadamente a la mitad, probablemente debido a que $\rho 1\Delta 450$ se ensambla con $\rho 1$ formando receptores que no son funcionales o con diferente cinética (resultados no mostrados). Para tratar de incrementar la expresión de $\rho 1\Delta 450$, el DNAc se introdujo en el plásmido de expresión pSP64T, el cual porta las regiones no traducibles localizadas corriente arriba y corriente abajo del gen de la β -globina de *Xenopus*. Previamente se ha demostrado que estas regiones incrementan la estabilidad de algunos RNAc y permiten una traducción más eficiente de los RNAc que codifican para receptores de serotonina (Ni *et al*, 1997). Pese a ello, otra vez no se logró generar corrientes inducidas por GABA, aún a altas concentraciones. Como tercera opción para lograr expresar este receptor, el DNAc de $\rho 1\Delta 450$ fue clonado en el plásmido pcDNA3. En éste, el DNAc de $\rho 1\Delta 450$ quedó bajo el control del promotor transcripcional de los genes tempranos del Citomegalovirus (CMV) humano y con el extremo 3' no traducible del gen de hormona del crecimiento bovino. El plásmido fue microinyectado directamente en el núcleo del oocito. Después de varios intentos se concluyó que esta tercera opción tampoco resultó en la producción de un receptor $\rho 1\Delta 450$ funcional.

En contraste, los oocitos inyectados con el DNAc de $\rho 1\Delta 51$ sí formaron receptores funcionales, tanto aquellos inyectados con RNAc, como los que fueron inyectados intranuclearmente con DNA, (Fig. 11). Los receptores expresados por $\rho 1\Delta 51$, como el receptor $\rho 1$ silvestre, no son bloqueados por el alcaloide bicuculina y no se desensibilizan ni aún después de ser expuestos por largo tiempo a GABA. Las corrientes inducidas por bajas (0.1-0.2 μ M) o altas (1 mM) concentraciones del agonista fueron bastante estables. Hay que hacer notar que en

algunas ocasiones las corrientes generadas decayeron apreciablemente después de exponerse a GABA (1mM), sin embargo el cambio en la conductancia se mantuvo constante mientras que el potencial de equilibrio generado por la acción de GABA cambió durante el tiempo en el que el oocito estuvo expuesto al agonista (Fig. 11B). De aquí se deduce que la aparente caída en la respuesta es debida principalmente a cambios en el gradiente de iones Cl^- a través de la membrana, ocasionado por la apertura simultánea de un gran número de canales, y no debido a una desensibilización real de los receptores. Este hecho debe tenerse en mente cuando se diga que una célula (c.f. retina) tiene receptores del tipo GABA_C que se desensibilizan.

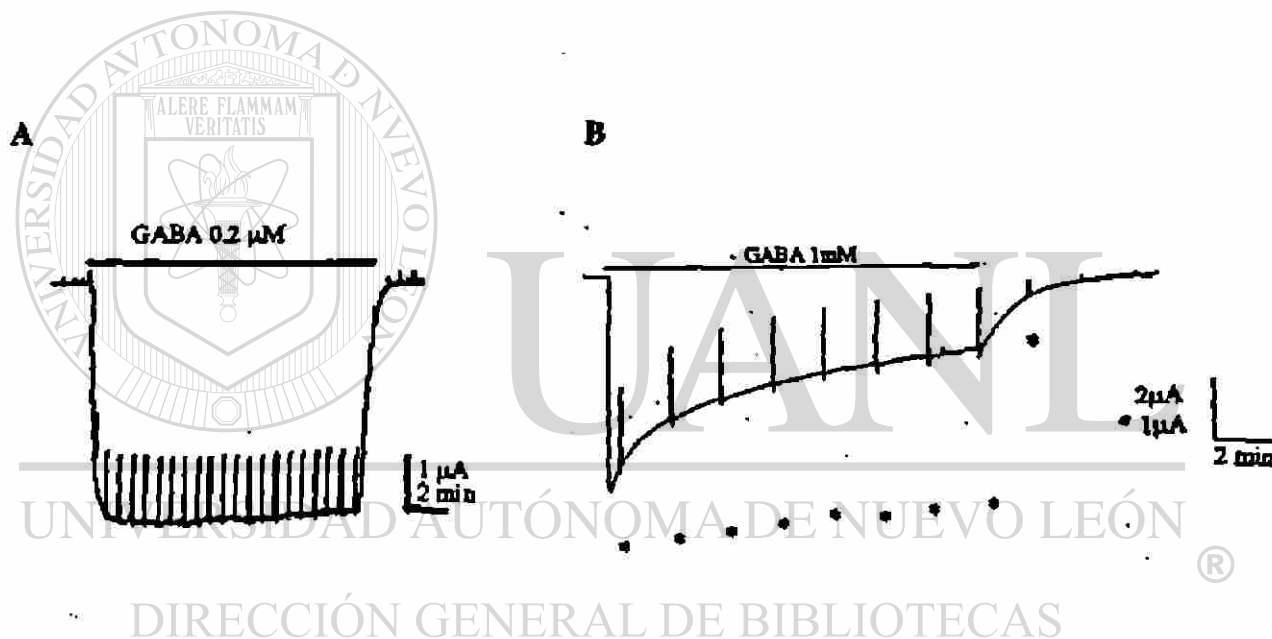


Figura 11. Expresión funcional de $\rho 1\Delta 51$ en oocitos de *Xenopus*. El RNAc de $\rho 1\Delta 51$ fue inyectado en oocitos de *Xenopus*. 48-72 h después, los oocitos generaron corrientes bastante robustas al ser expuestos a GABA. A) Las corrientes de $\rho 1\Delta 51$ no desensibilizan aún después de varios minutos de exposición al agonista (GABA 0.2 mM). B) El mismo oocito se expuso a una concentración de GABA más alta (1mM) y las corrientes así generadas aparentan desensibilizar. Sin embargo, la conductancia (indicada por * y medida al estimular el oocito con pulsos de -50mV por 1 se mantuvo relativamente constante.

3.1.3 Caracterización Farmacológica del Receptor $\rho 1\Delta 51$.

Con el fin de conocer las propiedades del receptor $\rho 1\Delta 51$ se probaron varios agonistas y antagonistas que son conocidos por sus acciones sobre los receptores $\rho 1$ y $GABA_A$. Primero se probó el efecto de los iones de Zn^{2+} , los cuales inhiben las respuestas a GABA en diversas preparaciones (Calvo *et al*, 1994; Chang *et al*, 1995; Dong y Werblin 1995, Wang *et al*, 1995). Los iones de Zn^{2+} bloquean al receptor $\rho 1$ de manera dosis dependiente y con una inhibición media (IC_{50}) de $9.2 \mu M$ (Calvo *et al*, 1994). El receptor $\rho 1\Delta 51$, activado por $5 \mu M$ de GABA, redujo su corriente generada a un 30% de la original cuando se expuso a $1 \mu M$ de Zn^{2+} (Fig. 12). Esta inhibición fue reversible después de lavar el oocito por 3 min para eliminar el catión.

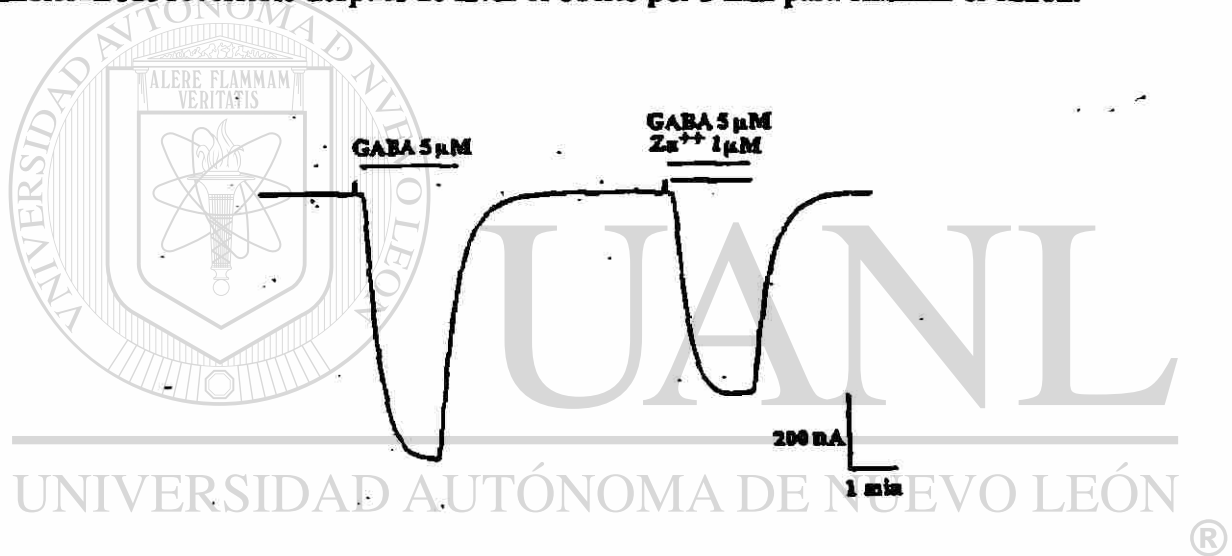


Figura 12. Bloqueo de $\rho 1\Delta 51$ por iones de zinc. Al igual que para los receptores $\rho 1$, las corrientes generadas por la isoforma $\rho 1\Delta 51$ (expresada en la membrana de oocitos) son bloqueadas por iones de zinc de una manera dosis-dependiente.

Además, se sabe que los lantánidos tienen efectos moduladores sobre los receptores $GABA_A$ y $\rho 1$ (Calvo *et al*, 1994; Im *et al*, 1992, Narahashi *et al*, 1994). Así mismo, en la isoforma $\rho 1\Delta 51$ el La^{3+} produjo un aumento rápido y reversible de las corrientes generadas por GABA. Este efecto fue mayor cuando se incrementó la concentración de La^{3+} . Su potencia fue

independiente del voltaje al que se fijó el oocito y fue menos aparente cuando el receptor fue activado por altas concentraciones de GABA.

Los aminoácidos glicina y β -alanina son capaces de activar receptores GABA_A y $\rho 1$ (Calvo et al, 1995; Wu et al, 1992). Con el fin de determinar si la delección en $\rho 151$ afecta la capacidad de $\rho 1$ para ser activado por estos neurotransmisores, se realizaron una serie de experimentos. Al probarse la acción de estas moléculas sobre el receptor expresado en oocitos, se encontró que la glicina genera corrientes con una EC_{50} de 1.2 mM y que β -alanina tuvo un efecto semejante aunque más potente (EC_{50} de 165 μ M) (Fig. 13).

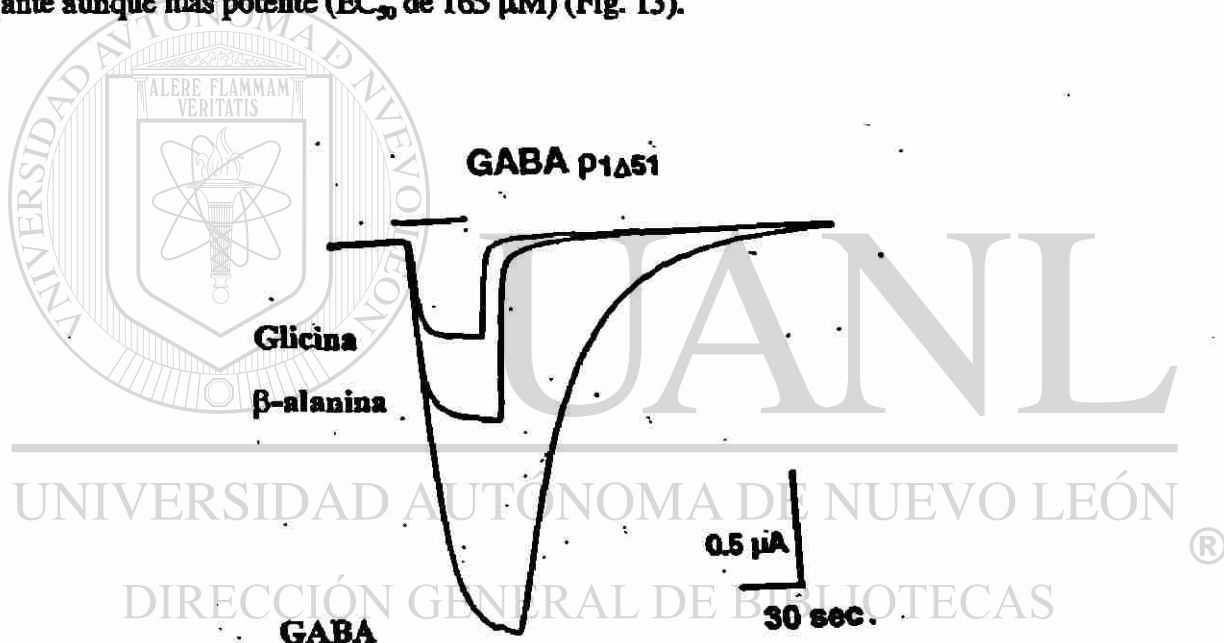


Figura 13. Corrientes generadas por GABA, glicina y β -alanina en oocitos inyectados con el plásmido de expresión de $\rho 1\Delta 51$. Estos registros muestran las corrientes generadas por GABA (3 μ M), β -alanina (3mM) y glicina (30mM). Como se puede observar las corrientes son robustas y no-desensibilizantes.

3.1.4 Distribución del Receptor $\rho 1$ en Tejido Cerebral Bovino.

Por medio de RT-PCR se demostró que tanto $\rho 1$ como $\rho 1 \Delta 51$ se expresan en varias áreas del sistema nervioso central bovino. Utilizando oligonucleótidos específicos que permiten reconocer los productos amplificados de ambas isoformas se demostró que $\rho 1$ y $\rho 1 \Delta 51$ se expresan en retina y cerebelo. Además, $\rho 1$ fué hallado en hipocampo, corteza y nervio óptico. Ninguno de los dos transcritos estuvieron presentes en el cuerpo caloso o en la amígdala (Fig. 14). En ninguna de las muestras analizadas se detectó la subunidad $\rho 1 \Delta 450$.

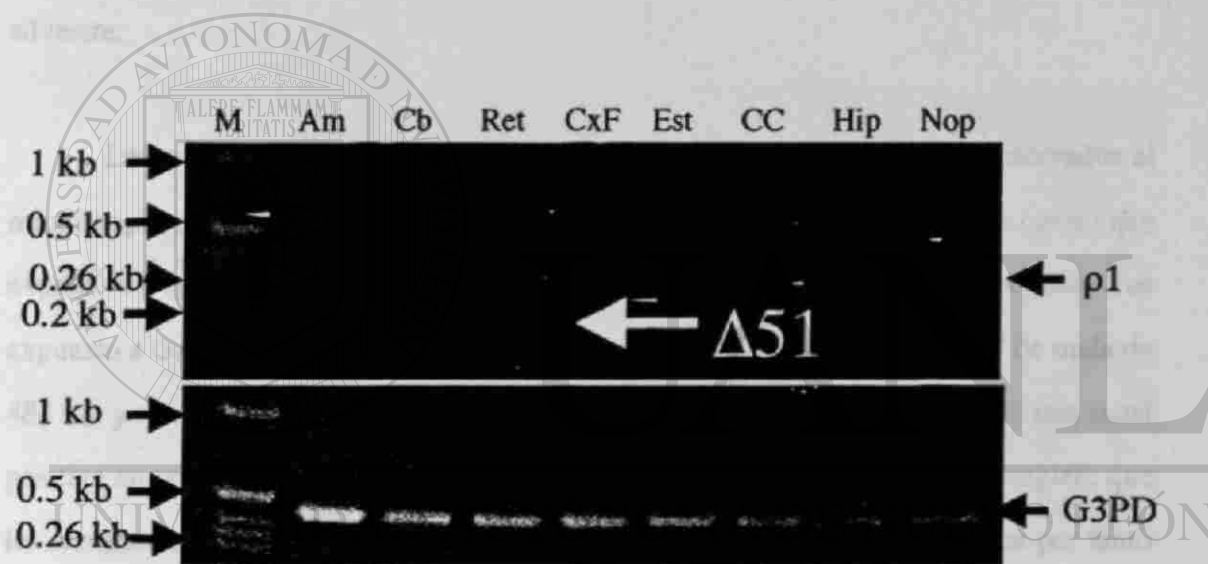


Figura 14. Análisis electroforético de los productos de RT-PCR de $\rho 1$ y $\rho 1 \Delta 51$ obtenidos de diversas áreas del cerebro. Utilizando oligonucleótidos específicos en reacciones de RT-PCR, se lograron distinguir dos de las isoformas de $\rho 1$ ($\rho 1$ y $\rho 1 \Delta 51$) en varias áreas del sistema nervioso central bovino: M: marcador de peso molecular, Am: amígdala, Cb: cerebelo, Ret: retina, CxF: corteza frontal, Est: estriado, CC: cuerpo caloso, Hip: hipocampo, Nop: nervio óptico. G3PD: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, que fue usada como control interno de la reacción de RT-PCR.

3.1.5 Expresión de Receptores $\rho 1$ en Fusión con GFP

La inyección del plásmido de expresión portando el gen quimérico $\rho 1$ -GFP indujo la formación de receptores funcionalmente idénticos al receptor silvestre. Por ejemplo, los receptores $\rho 1$ -GFP responden a bajas concentraciones de GABA, tienen una baja tasa de desensibilización, son insensibles a bicuculina y son antagonizados por TPMPA, el antagonista específico de receptores GABA_C, (Fig. 15). Además, también se determinó que la selectividad del canal del receptor quimérico por el ión cloro es igual a la del silvestre.

Los oocitos que expresaron receptores $\rho 1$ -GFP funcionales fueron observados al microscopio confocal de fluorescencia (Fig. 15). En esta figura se muestra un oocito que expresó receptores $\rho 1$ -GFP y que generó respuestas no desensibilizantes cuando fue expuesto a GABA Fig. 15 A,B). Estos oocitos, al ser excitados a una longitud de onda de 488 nm y al ser observados al microscopio confocal de fluorescencia, muestran una señal positiva en color verde fluorescente a lo largo de la periferia del oocito. Esto sugiere que los receptores quiméricos conservan todas sus características funcionales y que por tanto los receptores fluorescentes se encuentran muy posiblemente adecuadamente integrados en la membrana plasmática del oocito. Para tener pruebas más contundentes de que los receptores $\rho 1$ -GFP se encuentran en la membrana plasmática del oocito, se necesitarían anticuerpos específicos que detecten la proteína *in situ*. Sin embargo, como lo único que se inyectó fue la fusión $\rho 1$ -GFP, los receptores funcionales necesariamente deben ser producto de esta fusión, a menos que de alguna manera se pierda GFP, lo cual no es muy probable.

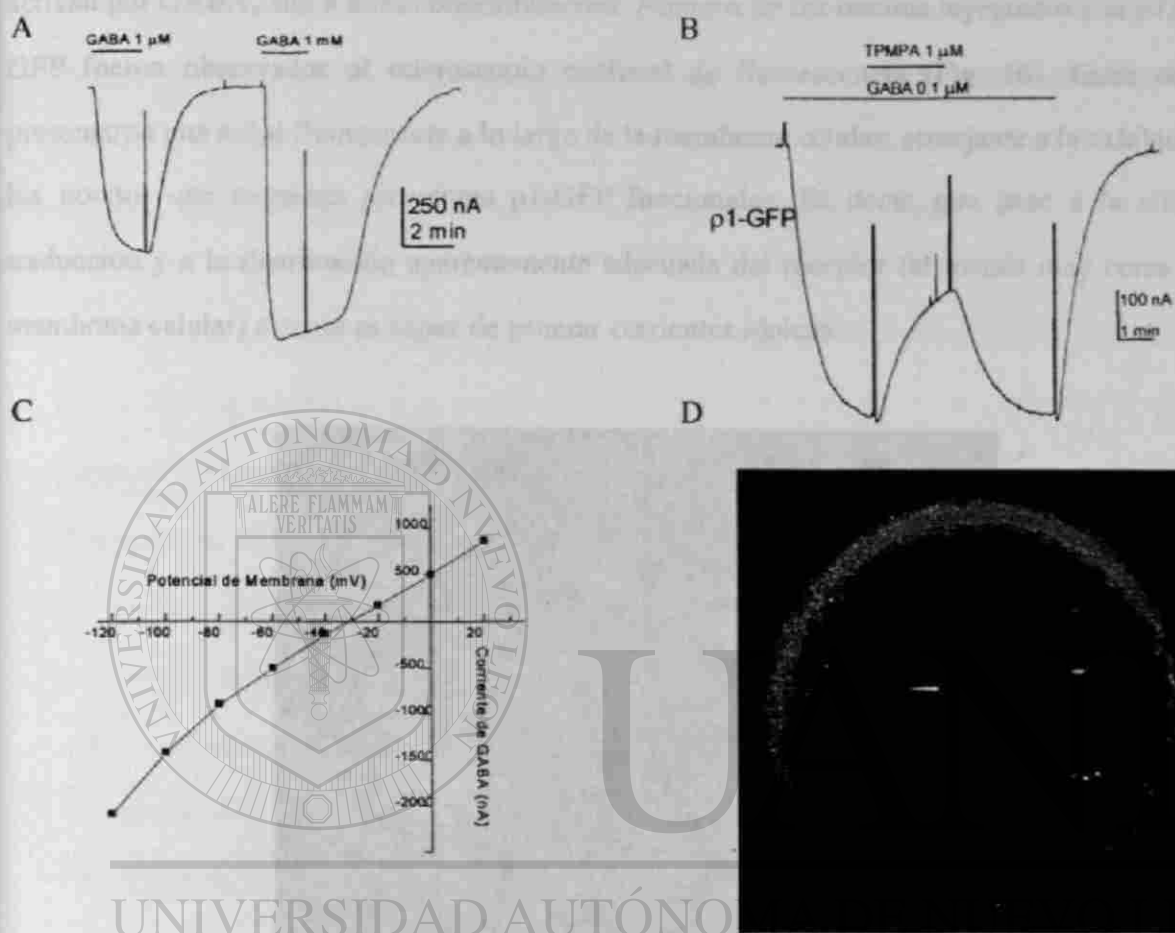


Figura 15. Caracterización funcional del receptor ρ 1-GFP. A) ρ 1-GFP expresa receptores funcionales que responden a GABA y no desensibilizan. B) las corrientes de ρ 1-GFP son bloqueadas por TPMPA, que es un antagonista específico de receptores GABA_C. C) La relación corriente/voltaje reveló que el potencial de equilibrio de este receptor ocurre alrededor de -30 mV, el cual corresponde al potencial de equilibrio del ión cloro y que es semejante al encontrado en los receptores ρ 1 silvestres. D) Imágen al microscopio confocal de fluorescencia de un oocito expresando receptores funcionales y que muestra fluorescencia principalmente a lo largo de la periferia del oocito.

Sin embargo, $\rho 1\Delta 450$ -GFP, al igual que $\rho 1\Delta 450$ silvestre, no formó receptores que se activan por GABA, aún a altas concentraciones. Algunos de los oocitos inyectados con $\rho 1\Delta 450$ -GFP fueron observados al microscopio confocal de fluorescencia (Fig. 16). Estos oocitos presentaron una señal fluorescente a lo largo de la membrana celular, semejante a la exhibida por los oocitos que expresan receptores $\rho 1$ -GFP funcionales. Es decir, que pese a la eficiente traducción y a la distribución aparentemente adecuada del receptor (al menos muy cerca de la membrana celular) éste no es capaz de generar corrientes iónicas.

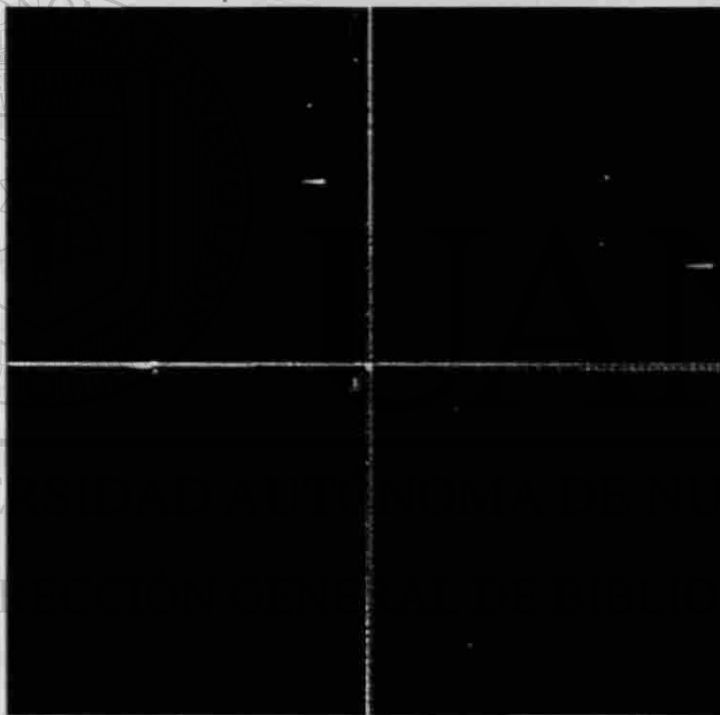


Figura 16. Expresión del receptor $\rho 1\Delta 450$ -GFP. Los oocitos inyectados con el DNAC de la quimera $\rho 1\Delta 450$ -GFP no respondieron a GABA. Estos mismos oocitos fueron vistos al microscopio confocal de fluorescencia y, como muestra la imagen en esta figura, la quimera se traduce eficientemente y su producto se distribuye cerca de la periferia del oocito. La figura muestra un solo oocito visto en cuatro diferentes planos para observar la distribución de la fluorescencia a lo largo de la superficie del oocito.

Así, si se compara la distribución de la fluorescencia emitida por los oocitos inyectados con $\rho 1$ -GFP con aquella emitida por los oocitos inyectados con $\rho 1\Delta 450$ -GFP se puede observar que no existe en apariencia diferencias en la distribución del receptor. En ambos casos la fluorescencia está concentrada hacia el hemisferio animal del oocito con muy baja o nula fluorescencia presente hacia el hemisferio vegetal.

Como se muestra en la figura 15 las respuestas generadas por el oocito inyectado con $\rho 1$ -GFP al ser expuesto a GABA son prácticamente similares a las generadas por $\rho 1$ silvestre. Sin embargo, algunas diferencias fueron encontradas después de varios ensayos de expresión. Por una parte, la proporción de oocitos expresando receptores funcionales fue siempre inferior al número de oocitos expresando $\rho 1$. Se obtuvieron generalmente entre un 30 y un 50% de oocitos expresando propiamente $\rho 1$ -GFP, y todos los oocitos que generaron corrientes de más de 500 nA (con 1 μ M GABA) mostraron fluorescencia a lo largo de la membrana plasmática. En los oocitos que generaron corrientes inferiores a 500 nA no se les logró detectar fluorescencia ni aún en el hemisferio animal, donde es más abundante. La segunda diferencia radicó en el tiempo de aparición de las respuestas a GABA. Generalmente los oocitos inyectados con $\rho 1$ generaron corrientes robustas a las 48 después de haber sido inyectados en el núcleo con el plásmido de expresión. $\rho 1$ -GFP generó corrientes hasta 72 h post-inyección, esto es, tardó al menos un día más en producir el suficiente número de receptores para generar corrientes lo suficientemente grandes para ser caracterizadas.

Finalmente, la proporción de oocitos expresando $\rho 1\Delta 450$ -GFP fue entre el 50 y 60%. Todos los oocitos que fueron observados al microscopio fueron ensayados electrofisiológicamente y no se logró determinar corrientes a GABA ni a otros agonistas como la glicina y la β -alanina.

3.2 LOS RECEPTORES GABA_C SE EXPRESAN EN EL SNC Y FORMAN HOMO-OLIGOMEROS FUNCIONALES AL EXPRESARSE EN OOCITOS DE *Xenopus*.

3.2.1 Expresión Funcional de Receptores del SNC en Oocitos y Ensayos de PCR.

El RNAm aislado de varias áreas del sistema nervioso central de rata y bovino inyectado en oocitos de *Xenopus* produjo receptores funcionales que respondieron a GABA. Estos receptores mostraron una fase de desensibilización rápida y fueron bloqueados por el alcaloide bicuculina, estas características corresponden a un receptor del tipo GABA_A. Los registros electrofisiológicos mostrados en la figura 17 muestran dos ejemplos en los que se puede ver claramente que las respuestas a GABA son robustas y que el potencial de expresión del RNAm es suficiente para observar corrientes generadas por diferentes clases de receptores. Al mismo tiempo, se puede apreciar que las corrientes no son bloqueadas totalmente por bicuculina, lo que sugiere que los receptores GABA_C se encuentren en estos tejidos, pero a niveles de expresión considerablemente bajos.

Además de los registros mostrados en la figura 17 también se obtuvieron respuestas a GABA en los oocitos inyectados con RNAm de hipocampo y nervio óptico aislado de bovinos y de corteza cerebral e hipocampo de rata. Ambas respuestas fueron generadas por receptores tipo GABA_A, sin embargo la magnitud de éstas fue bastante pequeña. No se obtuvieron respuestas a GABA en los oocitos inyectados con RNAm de cuerpo calloso o amígdala (bovino) ni de estriado (rata).

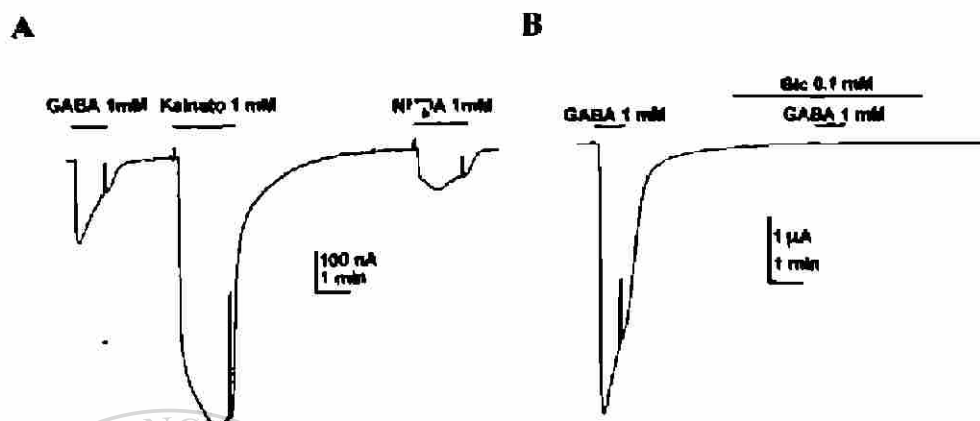
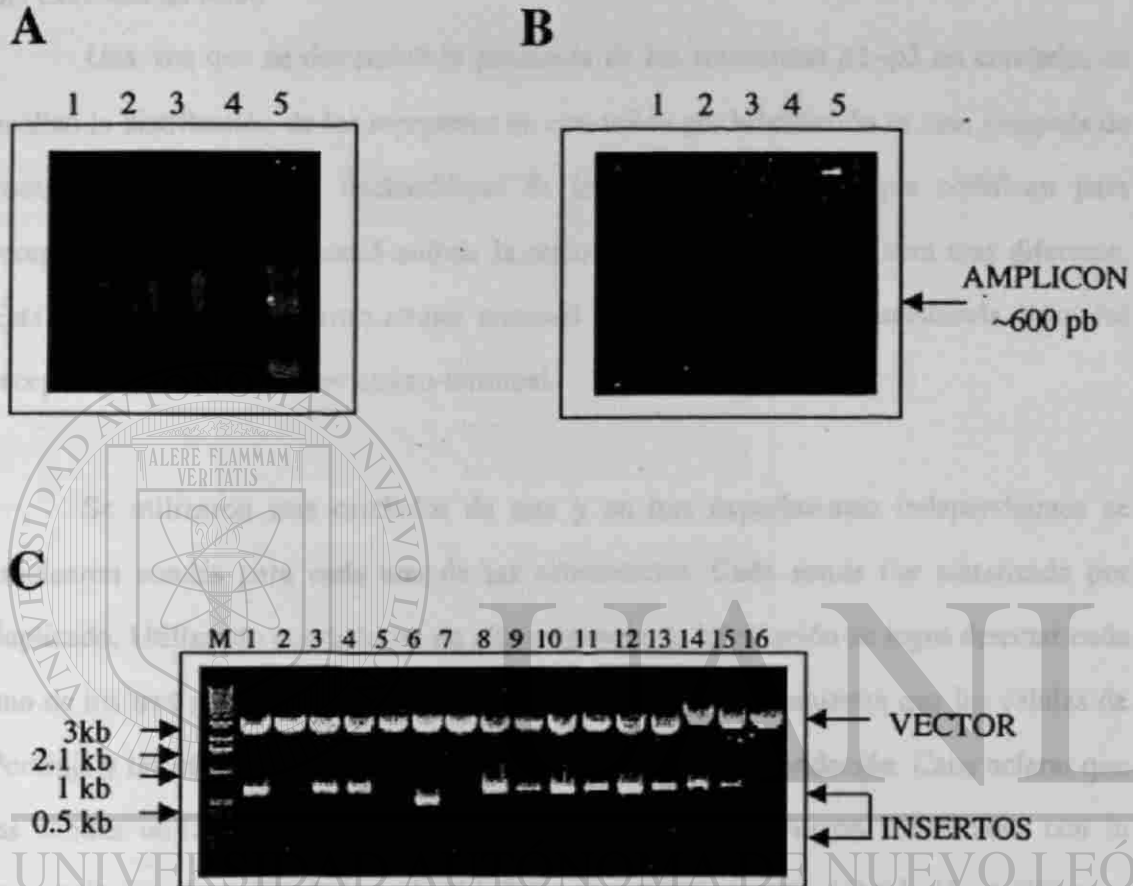


Figura 17. Expresión funcional de RNA polIA⁺ de cerebelo y corteza. A) Corrientes generadas por un oocito inyectado con RNA polIA⁺ de corteza cerebral al ser expuesto a los neurotransmisores GABA, kainato y NMDA, donde se observan respuestas robustas para cada uno de ellos. B) Respuestas generadas por GABA en un oocito inyectado con RNA polIA⁺ de cerebelo. Las respuestas en ambos casos corresponden a un receptor tipo GABA_A, sin embargo, debido a que aún en la presencia de bicuculina se registran corrientes pequeñas, se sospechó de la presencia de receptores GABA_C, aunque en muy bajas cantidades.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Efectivamente, utilizando RT-PCR (lo cual incrementó la resolución de detección pero no permitió el análisis funcional) se lograron detectar receptores del tipo GABA_C. Los fragmentos generados por PCR se clonaron en vectores plasmídicos y la figura 18C muestra algunos de los plásmidos analizados. A diez de las clonas positivas se les determinó su secuencia nucleotídica, las cuales permitieron ver que en el cerebelo se expresan $\rho 1$ (3 positivas), $\rho 2$ (6) y $\rho 3$ (1).

del Cerebelo de Rata.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 18. Tamizaje de genes similares a GABA_C. A) Gel de agarosa mostrando el RNA total aislado de 1: retina, 2: corteza cerebral, 3: hipocampo, 4: estriado, 5: cerebelo. B) Productos de RT-PCR de aproximadamente 600 pb, obtenidos a partir de los RNAs mostrados en el panel A. Se puede observar que la señal en retina es más fuerte que en cualquiera de las otras áreas cerebrales. C) Los DNAs sintetizados a partir de cerebelo, fueron ligados al vector pGEM-T y en esta fotografía se muestra el análisis electroforético de 16 clonas (derivadas a partir de la ligación) después de ser cortadas con *EcoRI*, con M se indica el carril correspondiente al marcador de peso molecular.

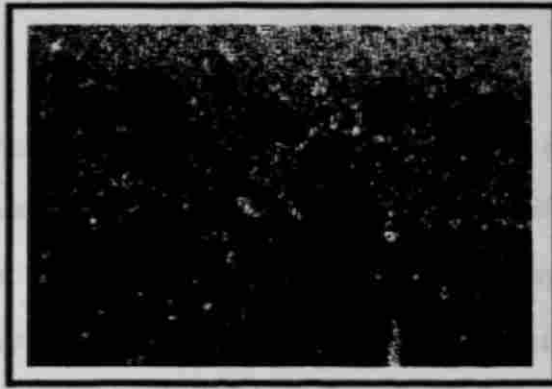
3.2.2 Los Receptores GABA_C se Expresan en las Células de Purkinje y de Golgi del Cerebelo de Rata.

Una vez que se determinó la presencia de los transcritos $\rho 1-\rho 3$ en cerebelo, se analizó la distribución de los receptores en este tejido por hibridación *in situ*. Después de comparar las secuencias nucleotídicas de los DNAs clonados que codifican para receptores GABA_C, se decidió utilizar la región donde la secuencia fuera mas diferente. Esta corresponde al extremo amino terminal que codifica para la secuencia líder del receptor y parte del extremo amino-terminal.

Se utilizaron seis cerebelos de rata y en tres experimentos independientes se emplearon sondas para cada una de las subunidades. Cada sonda fue sintetizada por duplicado. Utilizando condiciones de alta exigencia de hibridación se logró detectar cada uno de los tres genes en la corteza del cerebelo. La figura 19 muestra que las células de Purkinje y las células de Golgi presentan la mayor señal de hibridación. Cabe aclarar que las sondas utilizadas como control, es decir, aquéllas que fueron sintetizadas con la secuencia con el sentido de las subunidades, no mostraron señal de hibridación positiva.

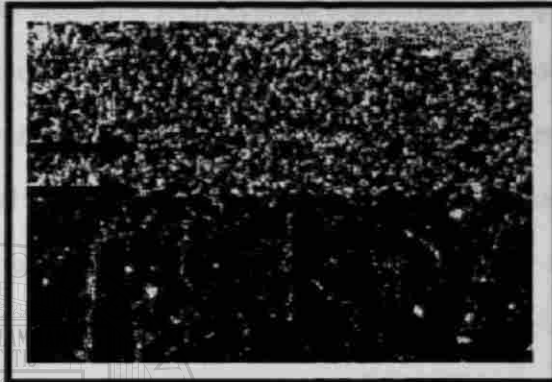
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CG
CPk



$\rho 1$

CG
CPk



$\rho 2$

CG
CPk



$\rho 3$

Figura 19. Determinación de la expresión de los receptores $\rho 1$ - $\rho 3$ por hibridación *in situ* en cortes de cerebelo de rata. Para determinar la distribución de las subunidades del receptor $GABA_C$ directamente en el tejido, se utilizaron sondas específicas para cada subunidad y la hibridación se llevó a cabo con altas condiciones de astringencia para eliminar cualquier posibilidad de hibridación cruzada. Se puede observar que las señales de hibridación son más fuertes en las células de Purkinje (CPk) y en algunas células de Golgi (CG).

3.2.3 Dos Receptores $GABA_C$ son Expresados en el Cerebelo Bovino

Mediante el uso de oligonucleótidos degenerados en reacciones de PCR, se lograron amplificar segmentos de DNAc con similitud a los receptores $\rho 1$ y $\rho 2$ humanos.

Dos de los DNAs que codifican para estos receptores fueron clonados después de tamizar una biblioteca de DNAs de cerebelo bovino y su identidad correspondió a $\rho 1$ y $\rho 2$ (referidos aquí como $b\rho 1$ y $b\rho 2$) (Fig. 20). Sin embargo, el receptor $b\rho 2$ presenta algunas diferencias que lo hacen ligeramente diferente al humano y al murino; esto puede deberse a diferencias alélicas o a diferencias específicas de especie. Los dos DNAs tienen las secuencias características básicas de un receptor ionotrópico: cuatro dominios ricos en aminoácidos hidrofóbicos (los cuales forman los cuatro segmentos transmembranales), una región hacia el extremo amino terminal que forma un supuesto puente disulfuro entre dos cisteínas y una asa intracelular grande entre el tercero y cuarto segmento transmembranal (Fig 20).

Ambos DNAs producen receptores que generan corrientes a GABA cuando son inyectados independientemente en oocitos de rana (Fig. 21) y los dos receptores son resistentes a la bicuculina y son específicamente antagonizados por 1,2,5,6 tetrahidropiridina-4-il-metilfosfinato (TPMPA). La tasa de desensibilización es baja, al igual que los receptores $\rho 1$ y $\rho 2$ humanos. Sin embargo, a diferencia del receptor $\rho 2$ de rata (Zhang *et al*, 1997) que no forma receptores por sí solo, el $b\rho 2$ sí es capaz de formar receptores funcionales independientemente de la presencia de cualquier otra subunidad accesoria. Posiblemente, esta capacidad refleja la existencia de la señal de "oligomerización" en el segmento extracelular del receptor, la cual está ausente en el gen de rata y presente en los genes $\rho 2$ de humano y ratón y en $\rho 1$ (Cutting *et al*, 1992, Greka *et al*, 1998, Hackman *et al*, 1997a,b). Por otra parte, ambos receptores son activados eficientemente por β -alanina y glicina. Generalmente las respuestas generadas por $b\rho 1$ fueron 10-20 veces mayores que las generadas por $b\rho 2$. Este resultado se obtuvo aún con diferentes preparaciones de RNAc e inyectando oocitos provenientes de varias ranas.

p1 bovino:

1 MREGIFLLW GWVLATESRM HWPGREVHEM SKKGRPORQR REVHEDAHKQ VSPILRRSPD
61 ITKSPLTKSE QLLRIDDHAF SMRPGFGGPA IPVGVVQVE SLDSISEVDM DFTMTLYLRH
121 YWKDERLSFP STNNLSMTFD GRLVKKIWVP DMFFVHSKRS FIDHTTTONV MLRVQPOGKV
181 LYSLRVTVTA MCNMFDSREP LDTOTCSLEI ESYAYTEDDL MLYWKKGNS LKTDERISLS
-----C=C-----
241 QFLIQEFHTT TKLAFYSSTG WYNRLYINFT LRRHIFFFLL QTYFPATLMV MLSWVSWID
TM1
301 RRAVPARVPL GITTVLTMST IITGVNASMP RVSYIKAVDI YLWVSEVFEV LSVLEYAAVN
TM2 TM3
361 YLTTVQERKE QKLREKLPCT SGLPPPERTAM LDGNYSDEGEV NDLDNYMPEN GEKPDMMVQ
421 LTLASERSSP QRKSQRSSYV SMRIDTHAID KYSRIIFPAA YILFNLIYWS IFS
TM4

p2 bovino:

1 MPYFTRLILF LFCLMVLVES RKPKRKRWTG QVEMPKPSHL YKKNLDVTKI RKGKPOQLLR
61 VDEHDFSMRP AFGGPAIPVG VDVQVESLDS ISEVDMOFTM TLYLRHYWKD ERLAFSSASN
121 KSMTFDGRLV KKIWVPDVFF VHSKRSFTHD TTDNIMLRV FPDGHVLYSM RITVTAMCMM
181 DFSHEPLDSQ TCSLELESYA YTDEDLMLHW KNGDESLKTD EKISLSQFLI QKFHTTSRLA
---C=C---
241 FYSSTGWYNR LYINFTLRRH IFFFLLQTYE PATLMVMSW VSEWIDRRAV PARVSLGITT
TM1 TM2
301 VLTMTTIITG VNASMPRVSY VKAVDIYLWV SEVFEVLSVL EYAAVNYLTT VQERKERKLR
TM3
361 EKEFCMCGML HSKTMMLDGS YSESEANSLA GYPRSHILTE EERQDKIVVH LGLSGEANAA
421 RKKGLLKGQT GFRIFONTHA IDKYSRLIEP ASYIEFNLIY WSVFS
TM4

Figura 20. Secuencia aminoacídica predicha a partir de la secuencia nucleotídica de los receptores bp1 y bp2 clonados de cerebelo bovino. Se muestra la región formada por el puente de cisteínas (C=C) y subrayados los cuatro segmentos hidrofóbicos que forman las regiones transmembranales (TM1-TM4). El DNAc de bp1 muestra tres cambios aminoacídicos con respecto a la contraparte humana V50, L72, Q335, mientras que bp2 cambia en dos posiciones I50 G80.

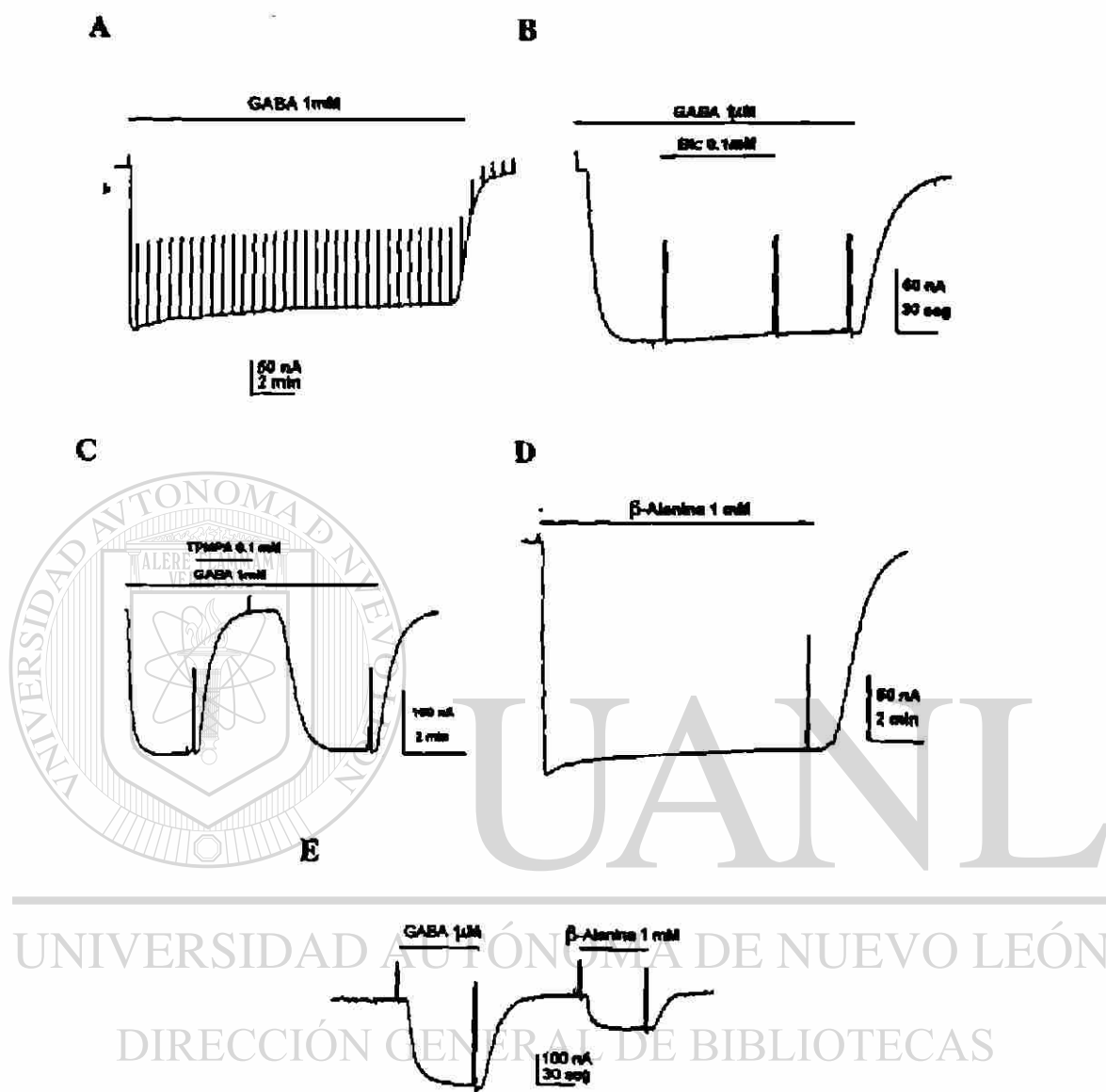
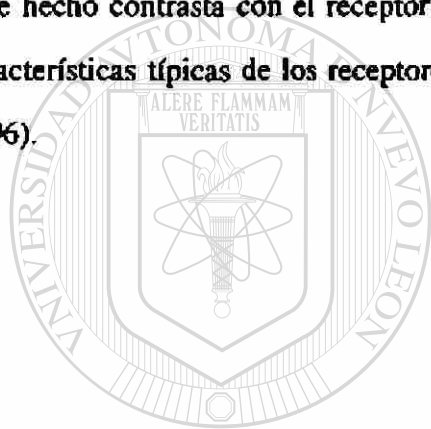


Figura 21. Caracterización funcional de los receptores $bp1$ y $bp2$ clonados a partir de cerebelo bovino. A) El receptor $bp1$ responde a GABA formando corrientes que no desensibilizan, aún después de estar expuesto al agonista por más de diez minutos. B) Este receptor es resistente al alcaloide bicuculina (Bic), lo cual es característico de los receptores $GABA_C$. C) $bp1$ es bloqueado en forma reversible por TPMPA, que es un antagonista específico de receptores $GABA_C$ (Murata et al 1996, Ragozzino et al 1996). D) β -alanina también evoca corrientes no desensibilizantes en $bp1$ y E) El receptor $bp2$ responde a GABA y β -alanina, aunque las corrientes generadas son menores a las de $bp1$.

3.2.4 Un Receptor Similar a $\rho 3$ se Expresa en Cerebro de Rata Pero no Expresa Receptores Funcionales en Oocitos.

Después de tamizar una biblioteca de DNAC de cerebro de rata se encontraron varias clonas con similitud nucleotídica a receptores GABA_C. Una de estas clonas, comparte una alto porcentaje de similitud nucleotídica (>99%) con el receptor $\rho 3$ expresado en retina de rata (Ogurusu *et al*, 1997) (Fig. 22). Sin embargo, el DNAC no forma receptores funcionales al ser inyectado en oocitos de *Xenopus*, aún después de ser expuesto a altas concentraciones de GABA. Este hecho contrasta con el receptor expresado en la retina, el cual produce receptores con las características típicas de los receptores GABA_C, cuando es expresado en oocitos (Shingai *et al*, 1996).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1 MVLAFWLAFF TYTWITLMLD ASAVKEPHQQ CLSSPKQTRI RETRMKDDL
61 TKWPLKREQ LLRIEDHDFS TRPGFGGSPV FVGIDVQVES IDSISEVMMD
121 FTMTFYLRHY WKDERLSFPS TTNKSMTEFR RLIQKIWVED IFFVHSKRSF
181 IHDTTVENIM LRVHPDGNVL FSLRITVSAM CEMDFSREFL DTQNCSLELE
-----C=C-----
241 SYAYNEEDLM LYWKHGKNSL NTEEHISLSQ FFIEEFSASS GLAFYSSTGW
301 INEVLRRRIE FFVLQTYFPA MLMVLSWVS FWIDRRAVPA RVSLGITTVL
TALERE FLAMMAN TMI TM2
361 TMSTIVTVGS ASMPQVSYVK AVDVYMWVSS LEVFLSVIEY AAVNYLTVE
VE TM3
421 EWKQLNRRGK ISGMYNIDAV QAMAFDGCYR DGETDVDQTS FFLHSEEDSM
471 RTKFTGSPCA DSSQIKRKSL GGNVGRILE NNHVIDTYSR IVFPWYITF
TM4
521 NLFYWGIYV

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 22. Secuencia aminoacídica del receptor rp3. El receptor rp3 fue clonado a partir de una biblioteca de DNAc de cerebro de rata. Aquí se muestra la secuencia aminoacídica predicha a partir del DNAc clonado. El puente de cisteínas en el extremo extracelular amino-terminal (C=C) y los cuatro segmentos transmembranales se muestran subrayados (TM1-TM4).

3.3 LAS MUTACIONES EN LOS SITIOS BLANCO DE FOSFORILACION NO MODIFICAN LA TASA DE DESENSIBILIZACION DE $\rho 1$.

3.3.1 Expresión de Receptores Mutantes en Oocitos de *Xenopus*

El receptor $\rho 1$ modificado en los residuos S425, S434 y S441, generó corrientes robustas cuando se expuso a GABA. Las características de las corrientes macroscópicas del receptor silvestre (tasa de desensibilización de 9.7%) se conservan igual en el receptor mutado (10.1%) después de 1 min de ser expuestos a GABA 10 μM (Fig. 23).

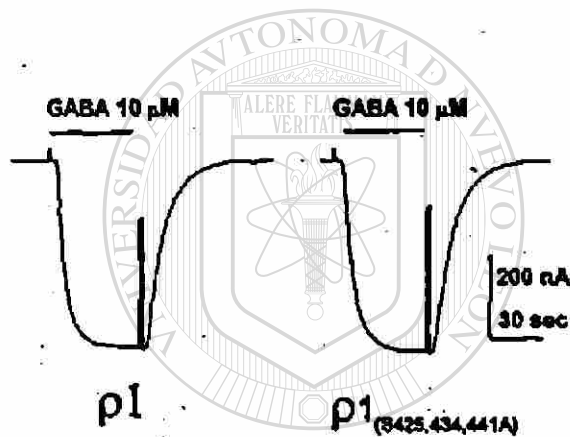


Figura 23. El receptor $\rho 1$ mutado en los aminoácidos blanco para la proteína-quinasa C conserva las propiedades del receptor silvestre. Las respuestas a GABA de los oocitos inyectados con el receptor mutado y el silvestre tienen las mismas características: no desensibilizan y no son antagonizadas por bicuculina.

La inyección de los RNAs de los receptores AT1 y $\rho 1$ en oocitos induce la expresión de los respectivos receptores funcionales, los cuales inducen amplias corrientes de membrana al ser activados por sus agonistas. La sola presencia de uno u otro receptor no altera significativamente el nivel de expresión del otro. Sin embargo, cuando el receptor AT1 es activado, se inicia una cadena de eventos que se manifiestan por la apertura de canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} , nativos del oocito. La activación de estos mensajeros secundarios condujo a que las respuestas subsecuentes del receptor $\rho 1$ se redujeran alrededor de un 30% (Fig. 24). Esta reducción fue reversible después de varias decenas de minutos, después de lo cual, las corrientes originadas por GABA alcanzaron los niveles obtenidos antes de la activación del receptor AT1.

Al realizar estos mismos experimentos con AT1 y con el receptor mutado $\rho 1_{(S42S, G34, A11A)}$ los resultados fueron semejantes a los obtenidos con el silvestre. Lo cual muestra que los tres residuos tampoco están involucrados en la caída de las respuestas obtenidas después de la activación de los receptores AT1 (Fig. 24).

3.3.2 La Segunda Asa Intracelular de $\rho 1$ no es Fosforilada *in vitro* por PKC o PKG.

Para lograr la expresión de las asas intracelulares de $\rho 1$ y $\beta 2$ en bacterias, se diseñaron oligonucleótidos que permitieron amplificar esta región por PCR, y a la vez introdujeron secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción que facilitaron su subclonación en la fase de lectura apropiada en el vector de expresión pMALc-2. La figura 25A muestra los ensayos de PCR donde se lograron amplificar las asas intracelulares de las dos subunidades, y la figura 25B muestra dos de los plásmidos recombinantes que portan el fragmento amplificado. La expresión de $\rho 1$ o de $\beta 2$ en fusión con el gen *malC* del plásmido pMALc2, condujo a la producción de proteínas recombinantes fácilmente distinguibles en geles de poliacrilamida-SDS (Fig. 25C). Las proteínas recombinantes se aislaron por cromatografía de afinidad y luego fueron sujetas a ensayos de fosforilación *in vitro*. Como muestra la figura 26, la asa del receptor $\beta 2$ presenta una banda positiva que indica la transferencia de grupos fosfato radiomarcados. En el mismo panel se puede observar que $\rho 1$ no es eficientemente fosforilado por PKC α ó por PKG. Estos resultados se repitieron luego variando la temperatura (24 a 37 °C) y el tiempo de fosforilación (1 hasta 24 h).

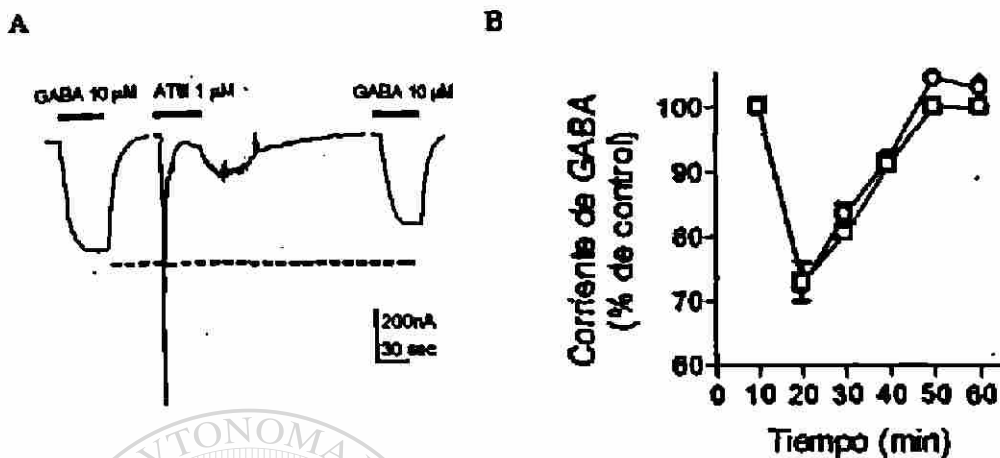


Figura 24. La activación del receptor AT1 inhibe las corrientes generadas tanto por el receptor $\rho 1$ como por $\rho 1_{[S425,434,441A]}$. A. Un oocito inyectado con los RNAs del receptor de Angiotensina (AT1) y de $\rho 1$ genera corrientes mediadas por ambos receptores. Las corrientes mostradas corresponden a una aplicación de GABA (10 μM) seguida por una de ATIII (1 μM) y diez minutos después, una segunda exposición a GABA (10 μM). Se puede observar que después que el receptor AT1 es estimulado, las respuestas subsecuentes del receptor $\rho 1$ disminuyen hasta un 70% del nivel alcanzado previo a la aplicación de ATIII. B. Después de ca. 40 min la magnitud de las corrientes de GABA alcanzan nuevamente los niveles controles. El mismo efecto fue encontrado cuando se expresó el receptor $\rho 1$ mutado en las serinas blanco para proteína-kinasa ($\rho 1_{[S425,434,441A]}$). Con el símbolo (O) se indican los niveles de las respuestas de $\rho 1$ y con (□) las originadas por el receptor mutado. Los registros electrofisiológicos mostrados muestran las corrientes generadas por GABA antes y después de la activación del receptor AT1. Las corrientes generadas por AT1 se distinguen por ser de carácter oscilatorio debido a la apertura de canales de cloro dependientes de calcio.

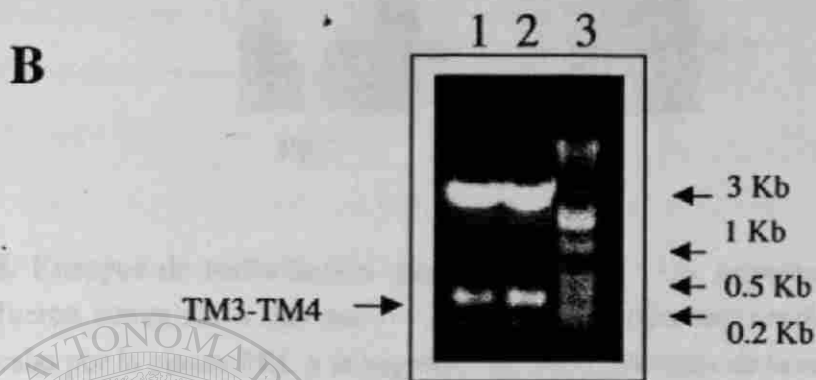
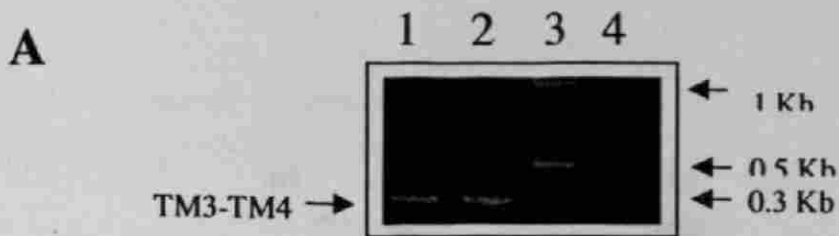


Figura 25. Construcción de plásmidos de expresión e inducción de la expresión en *E. coli*.
A) Productos de PCR que correspondientes a la amplificación de la región de la segunda asa intracelular de $\rho 1$ (carril 1) y $\beta 2$ (carril 2). El carril 3 muestra el marcador de peso molecular y el 4 un control negativo de amplificación. **B)** Dos plásmidos cortados con *Bam*H1 y *Pst*I portando 1: asa de $\rho 1$ y 2) asa de $\beta 2$. **C)** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de extractos totales de *E. coli* que fueron inducidas para la expresión de 2: MBP, 3: MBP- $\rho 1$ y 4: MBP- $\beta 2$. El carril 1 muestra un marcador de peso molecular.

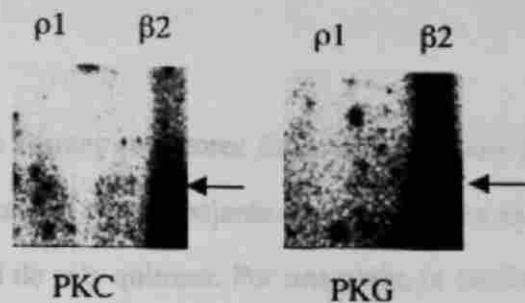


Figura 26. Ensayos de fosforilación por PKC y PKG. Las proteínas de fusión MBP- $\rho 1$ y MBP- $\beta 2$ fueron sometidas a dos reacciones de fosforilación independiente. Una reacción fue llevada a cabo por la cinasa PKC y la segunda por PKG. Después de la reacción ésta fue resuelta en un gel de poliacrilamida-SDS, el gel se secó y se expuso a película sensible a rayos X. La figura muestra la autorradiografía obtenida y como se puede observar, únicamente el carril cargado con MBP- $\beta 2$ muestra transferencia de grupos fosfato radiactivos, mientras que aquellos cargados con MBP- $\rho 1$ no se encuentra señal.

3.4 DETERMINACION DEL PAPEL DEL SEGUNDO SEGMENTO TRANSMEMBRANAL DE $\rho 1$ EN LA DESENSIBILIZACION DEL RECEPTOR

3.4.1 Expresión de los Receptores Quiméricos en Oocitos de *Xenopus*.

Cada uno de los genes quiméricos construidos se secuenciaron por el método de Sanger (Sambrook *et al.*, 1989) para asegurarse de la integridad de la fase de lectura del gen y de las modificaciones introducidas. Tomando como templados los plásmidos con las construcciones correctas se sintetizó *in vitro* el RNAc quimérico $\rho 1/\alpha 1$ (utilizando la RNA polimerasa de T7) y se inyectó en los oocitos. Los niveles de expresión detectados fueron muy bajos. Esto puede deberse a varios factores entre los que se sospechó de la inhabilidad del gen quimérico para formar receptores funcionales *homo-oligoméricos*. Con el fin de incrementar los niveles de producción de receptores funcionales $\rho 1/\alpha 1$, el gen quimérico correspondiente se introdujo en el vector de expresión pcDNA3 y esta construcción se inyectó directamente en el núcleo del oocito.

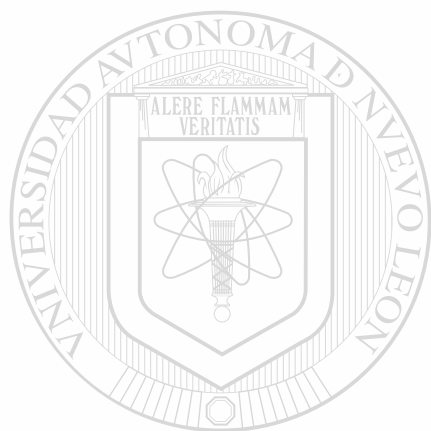
De este modo, se lograron respuestas más robustas, pero aun inferiores, comparadas con las respuestas del receptor $\rho 1$.

$\rho 1/\alpha 1$ fue capaz de formar receptores *homo-oligoméricos* funcionales que presentaron una cinética de desensibilización muy semejante a la del receptor $GABA_A$. La figura 27 muestra la caracterización funcional de esta quimera. Por una parte, la corriente membranal inducida por GABA presenta una activación rápida que desensibiliza inmediatamente, seguida de una fase de desensibilización lenta, contrastando dramáticamente con la cinética de los receptores $\rho 1$ y con la del resto de los receptores $GABA_C$. En aplicaciones consecutivas del agonista (GABA $1\mu M$), $\rho 1/\alpha 1$ desensibiliza de tal modo que después de la segunda aplicación algunos receptores permanecen inactivos. Las principales características farmacológicas del receptor coinciden casi por completo con las conferidas por la subunidad $\rho 1$ silvestre. Por ejemplo: los receptores $\rho 1/\alpha 1$ son bloqueados por iones de Zn^{2+} con la misma potencia y son modulados positivamente por iones de lantano también en la misma forma que los receptores $\rho 1$. Además, TPMPA, que es bloqueador específico de receptores $GABA_C$ (Murata *et al.*, 1996; Ragozzino *et al.*, 1996) actúa igualmente sobre los receptores $\rho 1/\alpha 1$, y éstos, al igual que el resto de los receptores $GABA_C$, son completamente insensibles a bicuculina. La curva de relación corriente/voltaje indicó que $\rho 1/\alpha 1$ es permeable a cloro, semejante a lo que sucede en el receptor $\rho 1$ (Woodward *et al.*, 1992a,b, 1993a,b).

La quimera $\rho 1_{(1-172)}/\alpha 1_{(1-172)}$ porta la región TM2 de la subunidad $\alpha 1$ que forma el canal iónico del receptor. Pese a que el receptor $GABA_A$ desensibiliza rápidamente y a que se especula que la tasa de desensibilización es dictada esencialmente por el segundo segmento transmembranal, los resultados obtenidos con esta construcción muestran que los receptores expresados por $\rho 1_{(1-172)}/\alpha 1_{(1-172)}$ conservan las características farmacológicas típicas de $\rho 1$: bloqueo por Zn^{2+} , modulación por

La^{3+} , insensibilidad a bicuculina y bloqueo por TPMPA (Fig. 28). Contrario a lo esperado, los niveles de desensibilización son semejantes a los receptores formados por la subunidad $\rho 1$ silvestre.

Generalmente, las corrientes generadas al activar $\rho 1_{[a1TM2]}$ con GABA fueron alrededor de cien veces mas pequeñas que las corrientes generadas por $\rho 1$. Sin embargo, esto no impidió una adecuada caracterización funcional y farmacológica del receptor expresado.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

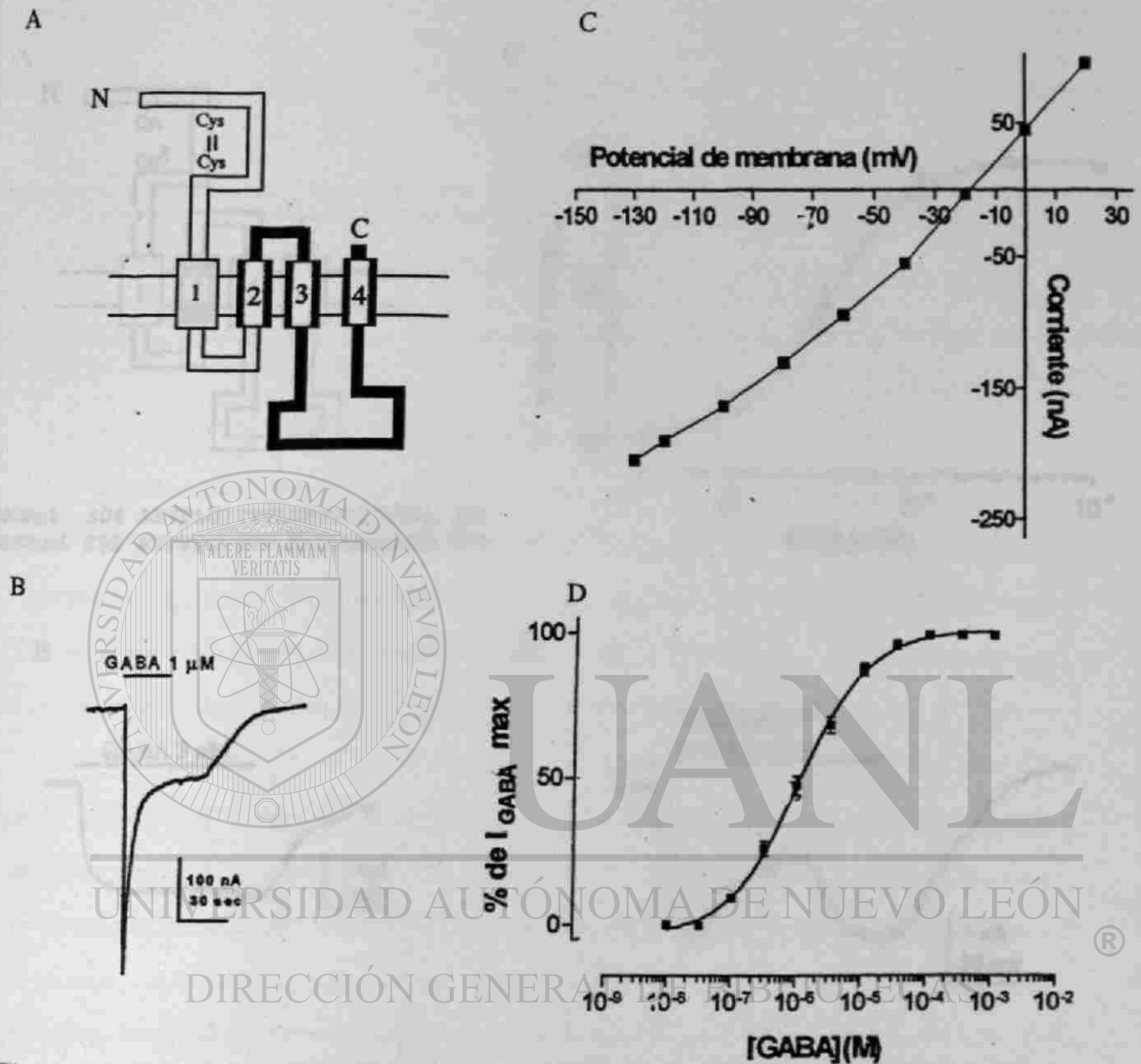


Figura 27. Caracterización funcional de la quimera $\rho 1/\alpha 1$. A) Respuesta típica de la quimera $\rho 1/\alpha 1$, la cual presenta una fase de desensibilización rápida que contrasta con las corrientes mantenidas de los receptores GABA_C. B) Relación corriente-voltaje, la cual muestra un potencial de equilibrio de ca. -20 mV. Para este experimento se aplicó GABA a 1 μ M. C) Diagrama de la estructura de $\rho 1/\alpha 1$ para mostrar el área compuesta por $\rho 1$ (hasta la primera asa intracelular) y la subunidad $\alpha 1$ (desde el segundo segmento transmembranal hasta el extremo carboxilo). D) La relación dosis-respuesta indica que la EC₅₀ de la quimera es semejante al receptor silvestre (1.2 μ M).

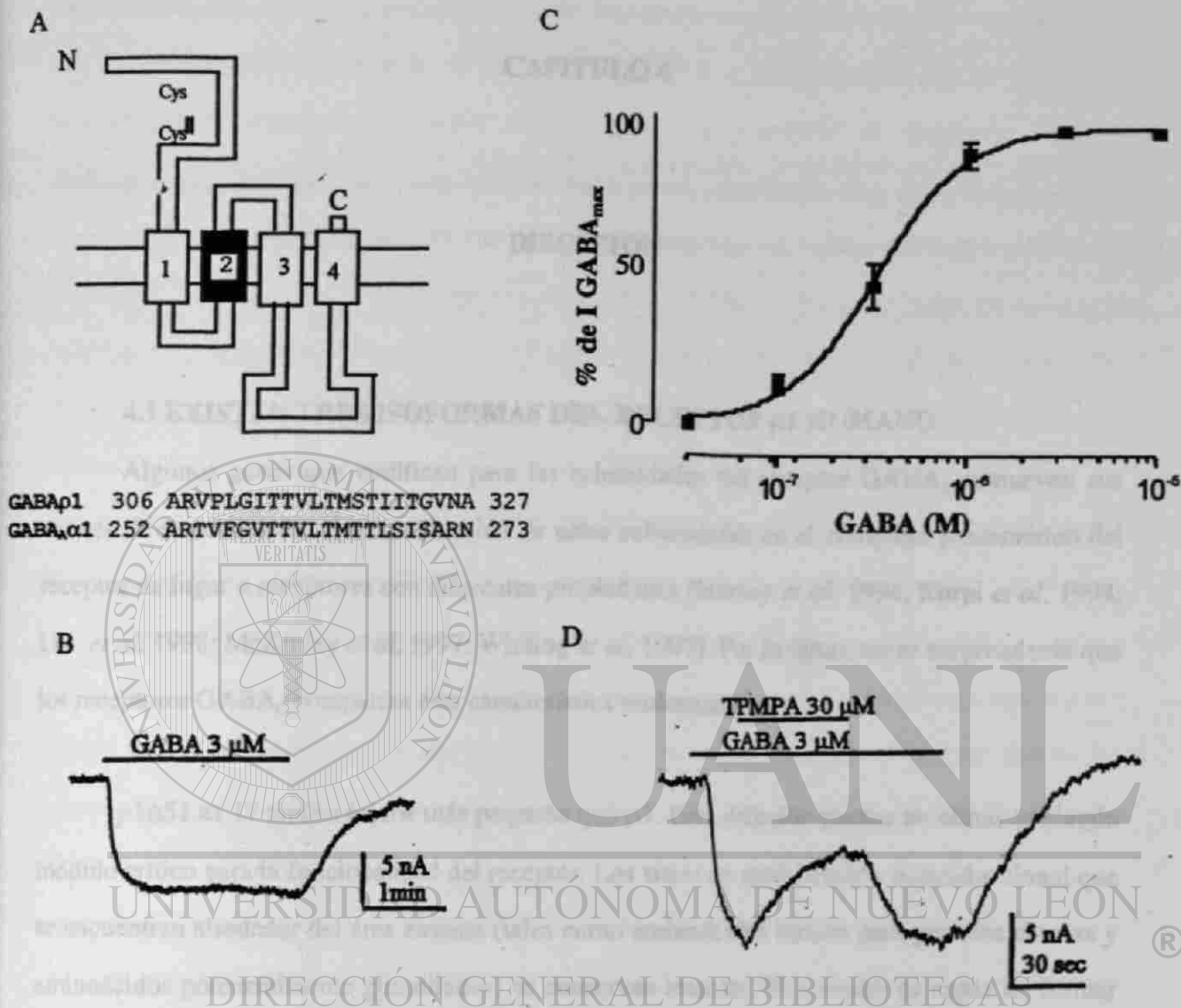


Figura 28. Caracterización funcional de la quimera $\rho 1_{[\alpha 1 T M 2]}$. Esta quimera se produjo mediante la sustitución del segundo segmento transmembranal de $\rho 1$ por el correspondiente de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A. **A)** Modelo de la estructura de una subunidad de $\rho 1_{[\alpha 1 T M 2]}$ ilustrando la posición del segundo segmento transmembranal que es ocupado por la región equivalente de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A. Se muestra una comparación entre las secuencias aminoacídicas de las regiones TM2 de $\rho 1$ y $\alpha 1$. **B)** El receptor $\rho 1_{[\alpha 1 T M 2]}$ no desensibiliza al ser expuesto a GABA. **C)** La curva dosis/respuesta reveló una EC₅₀ de 0.3 μ M, que asemeja más a la del receptor $\rho 1 \Delta 51$. **D)** El antagonista específico de receptores GABA_C, TPMPA, inhibe las corrientes generadas por GABA.

CAPITULO 4

DISCUSION

4.1 EXISTEN TRES ISOFORMAS DEL RECEPTOR $\rho 1$ HUMANO

Algunos genes que codifican para las subunidades del receptor GABA_A remueven sus exones diferencialmente. La combinación de estas subunidades en el complejo pentamérico del receptor da lugar a receptores con diferentes propiedades (Harvey *et al*, 1994; Korpi *et al*, 1994; Liu *et al*, 1998; McKinley *et al*, 1997; Whiting *et al*, 1997). Por lo tanto, no es sorprendente que los receptores GABA_C compartan esta característica molecular.

$\rho 1\Delta 51$ es 17 amino ácidos más pequeño que $\rho 1$. Esta delección parece no eliminar ningún módulo crítico para la funcionalidad del receptor. Los sitios de modificación postraduccional que se encuentran alrededor del área ausente (tales como aminoácidos blanco para proteína cinasas y aminoácidos potencialmente glicosilados) se conservan intactos. El receptor es capaz de formar receptores *homo-oligoméricos* que funcionan como los receptores $\rho 1$.

$\rho 1\Delta 450$ (la segunda isoforma clonada) presenta una delección de 450 nt. Este receptor no formó receptores funcionales en oocitos, aún y cuando se emplearon diversos sistemas plasmídicos de expresión (pSP64T y pcDNA3). Los sistemas de expresión empleados se han usado con otros receptores (incluyendo $\rho 1$). Todos ellos permiten la producción de receptores funcionales con un nivel de expresión tal que pueden ser fácilmente estudiados por métodos

electrofisiológicos que son capaces de detectar respuestas muy pequeñas. Aunque su capacidad para formar receptores funcionales no pudo ser comprobada, no se puede descartar la posibilidad de que $\rho 1\Delta 450$ tenga alguna función moduladora en el complejo de receptores $GABA_C$, inhibiendo la formación de receptores funcionales, o cambiando las propiedades de los receptores en las neuronas que lo expresan. La producción de subunidades que inhiben el ensamblaje apropiado de un receptor no es un evento raro en los receptores $GABA_A$. Por ejemplo, las subunidades $\alpha 6$ y $\beta 5$ producen isoformas por mecanismos de "splicing" alternativo. Estas isoformas, al co-expresarse con otras subunidades del receptor $GABA_A$ inhiben la formación de un receptor funcional. (Liu *et al*, 1998; Whiting *et al*, 1997). Por otra parte, los esfuerzos para detectar $\rho 1\Delta 450$ por RT-PCR en diversas áreas del SNC bovino, mostraron que esta subunidad no se expresa en aquellas en las cuales $\rho 1$ y $\rho 1\Delta 51$ fueron abundantes. Esto puede tener varias explicaciones, entre ellas que los "primers" utilizados en la reacción no fueran los adecuados para distinguir esta subunidad en bovinos o que el evento que da lugar a $\rho 1\Delta 450$ en retina humana no se efectúe en los bovinos. Para entender con mayor detalle los mecanismos que dan lugar a esta subunidad se deberá hacer un análisis más detallado de la estructura genómica de $\rho 1$.

Otras características conservadas en $\rho 1\Delta 51$ son: su resistencia a la bicuculina, el bloqueo por iones de zinc, modulación por lantano, activación por β -alanina y glicina y su baja tasa de desensibilización. Hasta ahora solo se ha encontrado una ligera diferencia en las curvas dosis-respuesta, las cuales indican que $\rho 1\Delta 51$ tiene una EC_{50} menor, es decir, es más sensible a GABA, aun cuando la saturación es semejante para ambos receptores.

El RNAm de $\rho 1\Delta 51$ se expresa en la retina, en cerebelo y nervio óptico bovino. Al parecer el transcrito es regulado de forma tejido-específica, ya que en otras áreas (hipocampo y

corteza) no se encontró, pese a la presencia de $\rho 1$. Este tipo de regulación del "splicing" se ha encontrado también en la subunidad $\gamma 2$ del receptor $GABA_A$ (Ashiya *et al*, 1995). En esta subunidad se remueve un exón de 24 nt en el transcrito expresado en la hipófisis, lo que da lugar a una subunidad más pequeña pero aun funcional ($\gamma 2S$) y la cual, al ser co-expresada con otras subunidades del receptor $GABA_A$, forma receptores con propiedades distintas a aquéllos formados con la subunidad alterna ($\gamma 2L$). Este mismo exón no es removido en la subunidad expresada en el cerebelo, médula espinal y tallo, lo que da lugar a la subunidad $\gamma 2L$, la cual es mas grande y también es funcional (Ashiya *et al*, 1995). Esta regulación tejido-específica plantea un problema muy interesante en los mecanismos moleculares de la expresión génica. Por ejemplo, aún no se conoce cuales son las secuencias nucleotídicas, ni cuales los factores celulares involucrados en la selección entre uno u otro exón de un transcrito primario. Mas aún, otros mecanismos de regulación postranscripcional pueden estar involucrados en procesos patológicos, tales como la esquizofrenia. Por ejemplo, en la corteza prefrontal de cerebros de pacientes esquizofrénicos, la proporción relativa de los transcritos de la subunidad $\gamma 2S$ se encuentra reducida en comparación a los niveles de la subunidad $\gamma 2L$ (Huntsman *et al*, 1998).

Este es un tema que deberá ser abordado más a fondo para definir con mayor precisión los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión génica neuronal.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La distribución diferencial de los transcritos alternativos de $\rho 1$ bovino así como sus diferencias funcionales sugieren que esta familia de receptores es más compleja de lo que inicialmente se pensaba y abre nuevas perspectivas en el estudio de la fisiología y regulación postranscripcional de los receptores $GABA_C$.

Como se mencionó anteriormente, los oocitos inyectados con $\rho 1\Delta 450$ no generaron corrientes iónicas detectables, aún cuando fueron expuestos a altas concentraciones de GABA y

a distintos potenciales de membrana (para tratar de incrementar alguna corriente generada por GABA). Las proteínas en fusión $\rho 1$ -GFP y $\rho 1\Delta 450$ -GFP permitieron aclarar varias preguntas. Primero, se demostró que el gen que codifica para $\rho 1\Delta 450$ es capaz de ser traducido a proteína, como lo indica la potente señal fluorescente encontrada en los oocitos inyectados con el gen artificial $\rho 1\Delta 450$ -GFP. Segundo, el receptor aparentemente es translocado a la membrana plasmática, aunque se necesitarán mayores estudios para determinar con mayor precisión la posición del receptor. Tercero, los receptores quiméricos permitieron ver que $\rho 1$ es lo suficientemente flexible para integrar una proteína completa en su extremo carboxilo (GFP, 27 KD), y que la presencia de esta proteína no altera las corrientes macroscópicas ni la farmacología básica del receptor.

4.2 Los Receptores GABA_C se Expresan en el Sistema Nervioso Central

Se utilizaron varias estrategias para demostrar que los receptores GABA_C no solamente se expresan en la retina, donde se descubrieron originalmente (Polenzani *et al*, 1991), sino que se encuentran también, aun cuando a bajos niveles, en varias áreas del cerebro.

La primera serie de experimentos se diseñó para explorar la posible expresión directa de receptores funcionales en oocitos de *Xenopus* inyectados con RNAm extraído de varias áreas del SNC. Aunque el sistema es bastante sensible (como se ha demostrado con la expresión de múltiples canales iónicos y receptores del SNC) (Gundersen *et al*, 1982a,b, 1983 a,b), en los experimentos mostrados aquí no se logró establecer de manera incontrovertible la presencia de receptores GABA_C. Esto es debido posiblemente a los bajos niveles de transcritos que codifican para estos receptores. Sin embargo, como lo muestran los registros electrofisiológicos de la figura 15, el potencial codificante de los RNAm inyectados en los oocitos, es suficiente para observar corrientes generadas por varios neuroreceptores, incluyendo GABA_A. En presencia de

altas concentraciones de bicuculina, se registraron pequeñas corrientes inducidas por GABA. Muy posiblemente estas corrientes fueron generadas por receptores GABA_C, pero el hecho de que las corrientes eran tan pequeñas impidió un análisis más detallado.

Utilizando oligonucleótidos degenerados en reacciones de RT-PCR, se encontraron amplicones que codifican para receptores GABA_C en cerebelo e hipocampo. No se encontraron transcritos para receptores GABA_C en la amígdala o en el cuerpo caloso. Aunque la técnica de PCR es más sensible para detectar transcritos que son poco abundantes, ésta no permite el análisis funcional del receptor, ya que se amplifica solamente una parte del DNAC que no contiene toda la información para la expresión de un receptor funcional. Algunos de los amplicones obtenidos por PCR se secuenciaron y se encontraron los tres receptores GABA_C ($\rho 1$, $\rho 2$ y $\rho 3$). Por primera vez estos resultados resolvieron a favor la noción de la posible expresión de receptores GABA_C en el cerebelo.

Una vez que se obtuvo evidencia sólida de la expresión de receptores GABA_C en varias áreas del SNC, se clonaron los DNACs que los codifican a partir de genotecas de cerebelo bovino. Los resultados arrojados por el tamizaje permitieron comprobar que la presencia de GABA_C fuera de la retina, no es un evento exclusivo de especie, ya que nuestros resultados muestran que tanto en rata como en bovinos estos receptores son expresados en varias áreas cerebrales, especialmente en el cerebelo. Cuando los DNACs clonados a partir de cerebelo se inyectaron en oocitos, éstos formaron receptores funcionales que respondieron a GABA. Las características electrofisiológicas y farmacológicas de $\rho 1$ y $\rho 2$ coinciden con las del resto de los receptores GABA_C previamente estudiados: bajos niveles de desensibilización y resistencia a la bicuculina (Polenzani *et al*, 1991, Cutting *et al*, 1991, 1992). Será interesante abordar en el futuro la posibilidad de que $\rho 1$ y $\rho 2$ se ensamblen para formar receptores constituidos por

ambas subunidades y de que estos receptores exhiban propiedades diferentes a aquellas formadas por receptores *homo-oligoméricos*.

Los resultados obtenidos por RT-PCR sugieren que los receptores GABA_C se expresan fuera de la retina y se encuentran con mayor abundancia en el cerebelo. Con el fin de determinar en que áreas y en que tipos celulares se encuentran los transcritos para cada una de las subunidades se realizaron ensayos de hibridación *in situ*. De esta manera se determinó que ρ_1 , ρ_2 y ρ_3 se encuentran en las células de Purkinje y de Golgi. La presencia de receptores GABA_C en los circuitos neuronales del cerebelo presenta un problema interesante relativo al flujo de la información interneuronal en este órgano.

Una vez realizado este trabajo se reportó que la subunidad ρ_2 se expresa en varias áreas del cerebro humano (Enz y Cutting, 1999), mientras que la expresión de la subunidad ρ_1 está restringida a la retina. Esto contrasta con los hallazgos aquí reportados, ya que tanto por RT-PCR como por hibridación *in situ* se encontraron señales positivas de expresión, especialmente en el cerebelo. Más aún, la clonación de DNAs que codifican para subunidades ρ a partir de bibliotecas de cerebelo bovino y corteza de rata, refuerza las evidencias encontradas inicialmente. Es posible que la restricción de la expresión de ρ_1 en el cerebro humano sea un evento propio de nuestra especie.

La subunidad ρ_3 de retina de rata inyectada en oocitos de rana expresa receptores que generan corrientes no desensibilizantes y resistentes a bicuculina (Ogorusu *et al*, 1997). El DNAc similar a ρ_3 , que fué obtenido de una biblioteca de DNAc de cerebro de rata, presenta algunos cambios en su secuencia nucleotídica que se traducen en cuatro sustituciones aminoacídicas en la región del amino-terminal del receptor. Sin embargo, estos cambios no son

drásticos pues los aminoácidos sustituidos tienen grupos funcionales similares. No obstante, el DNAC de $\rho 3$ de cerebro no formó receptores funcionales, como se demostró mediante el uso de tres sistemas de expresión ya descritos anteriormente. En base a estos resultados, se puede especular que las sustituciones aminoacídicas encontradas son la causa de la falta de formación de receptores funcionales. También se puede prestar a discusión el que esta subunidad sea específica del cerebro y que tal vez necesita la cooperación de subunidades auxiliares, como es el caso del receptor $\rho 2$ de rata (Zhong *et al*, 1997). Para abordar estas especulaciones serán necesarios más experimentos de expresión donde se combinen diferentes subunidades de ρ y también será necesario tener un conocimiento más preciso de la estructura genómica de $\rho 3$, así como del resto de los genes que codifican para las subunidades del receptor.

4.3 CAMBIOS EN LOS SITIOS DE FOSFORILACION EN LOS SITIOS DE FOSFORILACION DEL RECEPTOR $\rho 1$ NO AFECTAN SU TASA DE DESENSIBILIZACION

La evidencia experimental y el análisis de la secuencia aminoacídica del receptor $\rho 1$ hacen suponer que es modificado por mecanismos de fosforilación. Algunos antecedentes han propuesto que ésteres de forbol reducen la magnitud de las respuestas del receptor $\rho 1$ cuando es expresado en oocitos de *Xenopus* (Kusama *et al*, 1995). También existe evidencia de que el receptor GABA_A es eficientemente fosforilado por PKC *in vitro* y en células que expresan el receptor recombinante (Leidenheimer *et al*, 1992; Lin *et al*, 1996) y de que algunas de las secuencias blanco para esta enzima se conservan en $\rho 1$.

Los resultados de experimentos realizados en oocitos mostraron que las mutaciones en los sitios blanco de fosforilación para proteín-cinasas no inducen cambios en las respuestas del receptor $\rho 1$. Por otra parte los resultados obtenidos con los ensayos de fosforilación *in vitro* de

receptores recombinantes, no mostraron evidencia de que el receptor $\rho 1$ sea fosforilado por PKC α o por PKG. Estos resultados no descartan que el receptor sea fosforilado por estas enzimas en alguna otra región del receptor. Tampoco se descarta que los cambios en el receptor mutado no se reflejen en las corrientes macroscópicas obtenidas y que las modificaciones puedan ser detectadas a nivel del comportamiento de la cinética del canal o de otras características del receptor. Para determinar si estos tipos de cambios ocurren en los receptores $\rho 1$ mutados, deberá hacerse un estudio biofísico más detallado que involucre la determinación precisa de la conductancia y tiempo de apertura del canal del receptor silvestre, así como del mutado.

El efecto que tiene la activación del receptor AT1 sobre $\rho 1$ y $\rho_{(S425, S423, S441, A)}$ tiene repercusiones interesantes para la fisiología de ambos receptores. Se especula que la activación de un receptor puede modificar la actividad de un segundo receptor, sin que el agonista del primero actúe directamente sobre el segundo. La cascada de eventos que desencadena la activación de AT1, afecta de manera indirecta la función de $\rho 1$. Este efecto no es llevado a cabo por regulación en los sitios blanco de fosforilación S425, S423 y S441, como lo muestra el resultado de los experimentos de co-expresión con el receptor mutado. Esto no hace a un lado la posibilidad de que el receptor sea modificado por fosforilación en otro dominio o que en la retina (que es el tejido donde se encuentra con más abundancia el receptor $\rho 1$) se exprese una clase especial de proteína-quinasa que modifique específicamente al receptor. Otra opción es que la activación del receptor AT1 promueva la modificación de alguna proteína que funcione como "ancla" a la membrana del receptor $\rho 1$, y que esta proteína sea modificada por la activación de AT1. Recientemente se encontró que la proteína asociada a microtúbulos tipo 1B (MAP1B) funciona como "unión" entre $\rho 1$ y el citoesqueleto en la retina de vertebrados (Hanley *et al*, 1999). Además se sabe que MAP1B es regulada por fosforilación y la presencia de MAP1B desfosforilada es necesaria para la unión con las proteínas del citoesqueleto (Pedrotti e Islam

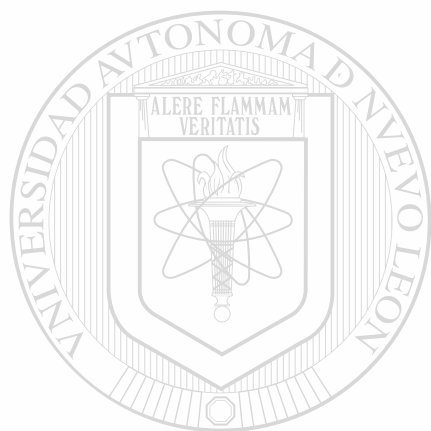
1996; Pedrotti *et al*, 1996). Esta unión podría ser modificada cuando el receptor AT1 es activado, debido a la variedad de cascadas metabólicas que este receptor activa, y es posible que alguna de éstas permita la modulación de la magnitud de la función del receptor a través de la inactivación de la proteína de unión MAPIB. Otra serie de experimentos deberán ser diseñados para responder a estas preguntas.

4.4 EL SEGUNDO SEGMENTO TRANSMEMBRANAL $\rho 1$ NO DETERMINA LA BAJA TASA DE DESENSIBILIZACION DEL RECEPTOR

Algunos estudios indican que el segundo dominio transmembranal de la familia de receptores ionotrópicos está involucrado en la cinética de desensibilización y que algunos residuos de este dominio están involucrados en esta función (Im *et al*, 1995; Revah *et al*, 1991; Palma *et al*, 1998). Los resultados presentados aquí demuestran que el segundo segmento transmembranal de $\rho 1$, por sí solo, no es responsable de la baja desensibilización del receptor. Esto se deduce de los experimentos en los que el segundo segmento transmembranal de $\rho 1$ es sustituido por el de un receptor de desensibilización rápida (subunidad $\alpha 1$ de GABA_A) y esta modificación por sí sola, no fue suficiente para alterar la cinética del receptor.

La quimera $\rho 1/\alpha 1$ mostró ser de vasta información funcional y farmacológica. Primero, la tasa de desensibilización se vio dramáticamente afectada y (como se concluyó de los experimentos mostrados anteriormente) debido a que TM2 no es el responsable exclusivo de este comportamiento, se puede especular que los dominios localizados entre TM2 y el codón de terminación son los que transfieren este fenotipo. Posiblemente no es solo una región la que determina la tasa de desensibilización y quizás es necesaria la cooperación de otras regiones del receptor. Para redondear estas conclusiones, se requieren más experimentos que involucren el intercambio de diversas regiones del receptor. Segundo, la presencia del segmento extracelular

del receptor $\rho 1$ fué suficiente para que el receptor quimérico conservara la resistencia a bicuculina y para ser bloqueado por TPMPA. Esto permite especular que los sitios localizados en la región extracelular del receptor transfieren estas características a la quimera. Además, también se conservan el bloqueo por iones de Zn^{2+} y la potenciación por La^{3+} , aunque las mismas características son compartidas por los receptores $GABA_A$.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Al iniciar este estudio se conocía muy poco sobre la estructura, función y farmacología de los receptores GABA_C. Después de la clonación de varios miembros de esta familia, se ha obtenido información más precisa sobre las características funcionales de las subunidades que forman estos receptores.

Aquí se describen experimentos que condujeron a la clonación de isoformas funcionales del receptor $\rho 1$, originadas por "splicing" alternativo (Marínez-Torres *et al*, 1998). Este mecanismo no es raro en los genes de la familia de receptores GABA_A (Harvey *et al*, 1994; Korpi *et al*, 1994; Liu *et al*, 1998; McKinley *et al*, 1997; Whiting *et al*, 1997), pero en receptores GABA_C marca el primer indicio claro de una diversidad más grande de la esperada. Esta diversidad se vé aumentada por el hecho de que $\rho 1$ es regulado además en un patrón específico de tejido.

También se presentan evidencias de la expresión de receptores GABA_C fuera de la retina. Estos hallazgos se hicieron siguiendo diferentes metodologías: inyección de RNAm a oocitos de rana, RT-PCR, hibridación *in situ* y clonación molecular de dos DNAs a partir de bancos de DNAs de cerebelo bovino y uno de cerebro de rata. La presencia de estos receptores y de una de

sus formas alternativas en el SNC, formula nuevas preguntas sobre el papel que pueden jugar en la fisiología del cerebro y particularmente del cerebelo de mamíferos.

Como resultado de otra serie de estudios se encontró que el receptor $\rho 1$ no es modificado directamente por proteín-cinasas. A la vez, se demostró que la activación del receptor AT1 inhibe las respuestas del $\rho 1$ mediante un mecanismo que involucra cascadas metabólicas intracelulares. Aunque las vías metabólicas involucradas aún no se han caracterizado con detalle, este estudio hace notar que existen interacciones entre neurotransmisores y receptores a través de una red de componentes intracelulares que pueden afectar la actividad de los neuroreceptores.

El mecanismo de desensibilización de $\rho 1$ fue abordado mediante la construcción de algunos receptores mutantes y otros receptores quiméricos que se construyeron *in vitro*. Estos estudios descartaron que las serinas que son blancos potenciales de fosforilación y que están localizadas en la segunda asa intracelular de $\rho 1$, jueguen un papel crítico en la baja tasa de desensibilización del receptor. Por otra parte, gracias a la expresión de las quimeras $\rho 1/\alpha 1$ se "disecaron" algunas regiones funcionales del receptor y se descartó al segundo segmento transmembranal del receptor, como responsable exclusivo de la baja tasa de desensibilización. Además, estos resultados permitieron iniciar la "disección" de posibles sitios farmacológicamente importantes. Por ejemplo, la sola presencia del dominio extracelular confiere a los receptores quimera la resistencia a bicuculina y la especificidad del bloqueo por TPMPA.

Consideraciones Finales y Perspectivas

Los resultados aquí presentados plantean muchas preguntas que deberán ser abordadas utilizando técnicas de biología molecular y estructural y electrofisiología. Por ejemplo, ¿cuáles

son los mecanismos de regulación que permiten la presencia de una forma alternativa del receptor en diferentes áreas del SNC y no en otras?. ¿En que parte están localizados los receptores GABA_C en la corteza cerebral? y ¿cual es la función de estos receptores en el cerebelo? Por otra parte, los mecanismos de regulación transcripcional de cada uno de los genes de las subunidades que forman el receptor GABA_C son desconocidos y su estudio tal vez permita encontrar secuencias nucleotídicas y factores transcripcionales que sean exclusivos o enriquecidos en la retina. Sin duda los genes quiméricos construídos permitirán estudiar más a fondo los mecanismos biofísicos involucrados en la cinética de los canales formados por los receptores GABA_C. Además, aún se desconoce en detalle la conductancia y tiempo de apertura de los receptores silvestres y sería interesante saber como se modifican estas propiedades cuando se transfieren módulos de otros receptores (como el GABA_A). Además, el estudio de la estructura tridimensional de estos receptores es prácticamente inexistente y será de mucha importancia obtener imágenes de cristales formados por este receptor para comprender más detalladamente su función. En particular el estudio de cómo la estructura de un receptor es modificada al momento de la activación e inactivación del mismo y cómo la estructura del canal iónico permite selectivamente la entrada de un solo tipo de ion. Los genes en fusión con la Proteína Verde Fluorescente permitieron observar el comportamiento del receptor expresado en la membrana del oocito y seguramente un estudio detallado ayudará a definir los procesos involucrados en la síntesis, maduración y tráfico intracelular del receptor además de su posible internalización e interacción con otras proteínas. El estudio de la participación de estos receptores en patologías del sistema nervioso también es una línea de investigación prácticamente inexplorada. Finalmente, el papel de los receptores GABA_C en la fisiología de la retina está apenas abordandose sistemáticamente y seguramente la combinación de métodos electrofisiológicos y farmacológicos, junto con métodos moleculares y tecnología de animales transgénicos permitirán grandes avances en la comprensión del papel funcional de estos receptores.

Referencias

- Amin, J. y Weiss, D.S. (1994) Homomeric $\rho 1$ GABA channels: activation properties and domains. *Receptors and Channels*. **2**:227-236.
- Ashiya, M. y Grabowski, P.J. (1997) A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA of the rat cerebellum. *RNA*. **2**:1241-1253.
- Bailey, M.E., Matthews D.A., Riley B.P., Albrecht B.E., Kostrzewa M., Hicks A.A., Harris R., Muller U., Darlison, M.G. y Johnson K.J. (1999) Genomic mapping and evolution of human GABA_A receptor subunit gene clusters. *Mammalian Genome*. **10**:839-843.
- Bamber, B.A., Beg, A.A., Twyman, R.E. y Jorgensen, E.M. (1999) The *Caenorhabditis elegans* *unc-49* locus encodes multiple subunits of a heteromultimeric GABA receptor. *J. Neurosci*. **19**:5348-5359.
- Birnir, B., Tierney, M.L., Lim, M., Cox, G.B. y Gage, P.W. (1997) . Nature of the 5' residue in the M2 domain affects function of the human $\alpha 1\beta 1$ GABA_A receptor. *Synapse*. **26**:324-327.
- Birnir, B., Tierney, M.L., Dalziel, J.E., Cox, G.B. y Gage, P.W. (1997) A structural determinant of desensitization and allosteric regulation by pentobarbitone of the GABA_A receptor. *J. Membrane Biol.* **155**:157-166.
- Boue-Grabot, E., Dufy, B. y Garret, M. (1995) Molecular diversity of GABA-gated chloride channels in the rat anterior pituitary. *Brain Res.* **704**:125-129.
- Calvo, D.J., Vazquez, A.E. y Miledi, R. (1994). Cationic modulation of $\rho 1$ -type γ -aminobutyrate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:12725-12729.
- Calvo, D.J. y Miledi, R. (1995) Activation of GABA $\rho 1$ receptors by glycine and β -alanine. *Neuroreport*, **6**:1118-1120.
- Calvo, D. J. y Miledi, R. (1998) Interaction of benzodiazepines with homomeric GABA $\rho 1$ receptors from human retina. 28th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Part 2, Los Angeles, California, USA, Noviembre. Society for Neuroscience Abstracts. **24**: 2038.

- Cash, D.J. y Subbarao, K. (1988) Different effects of pentobarbital on two γ -aminobutyrate receptors from rat brain: channel opening, desensitization, and an additional conformational change. *Biochemistry*. 27:4580-4590.
- Celentano, J.J. y Wong, R.K. (1994) Multiphasic desensitization of the GABA_A receptor in outside-out patches. *Biophys. J.* 66:1039-1050.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. y Prasher DC. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263:802-805.
- Chang, Y., Amin, J. y Weiss, D.S. (1995) Zinc is a mixed antagonist of homomeric $\rho 1$ γ -aminobutyric acid-activated channels. *Mol. Pharm.* 47:595-602.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 162:156-159.
- Connolly, C.N., Krishek, B.J., McDonald, B.J., Smart, T.G. y Moss, S.J. (1996) Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric γ -aminobutyric acid type A receptors. *J. Biol.Chem.* 271:89-96.
- Costa, E. y Guidotti, A. (1996) Benzodiazepines on trial: a research strategy for their rehabilitation. *Trends Pharm. Sci.* 17:192-200.
- Cutting, G.R., Curristin, S., Zoghbi, H., O'Hara, B., Seldin, M.F. y Uhl GR. (1992) Identification of a putative γ -aminobutyric acid (GABA) receptor subunit $\rho 2$ cDNA and colocalization of the genes encoding $\rho 2$ (GABRR2) and $\rho 1$ (GABRR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4. *Genomics*. 12:801-806.
- Cutting, G.R., Lu, L., O'Hara, B.F., Kasch, L.M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D.M., Shimada, S, Antonarakis, S.E., Guggino, W.B. y Uhl, G.R. (1991) Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) $\rho 1$ cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:2673-2677.

- Dong C.J. y Werblin F.S. (1995) Zinc downmodulates the GABA_C receptor current in cone horizontal cells acutely isolated from the catfish retina. *J. Neurophys.* 73:916-919.
- Dong C.J. y Werblin F.S. (1998) Temporal contrast enhancement via GABA_C feedback at bipolar terminals in the tiger salamander retina. *J. Neurophys.* 79:2171-2180.
- Dumont J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morph.* 136:153-179.
- Enna, S.J. y Bowery, N.G. (1997) The GABA receptors. 2da Edición. The Human Press. Totowa, New Jersey, EUA. 332pp.
- Enz, R., Brandstaetter, J.H., Hartveit, E., Waessle, H. y Bormann, J. (1995). Expression of GABA Receptor $\rho 1$ and $\rho 2$ Subunits in the retina and brain of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1495-1501.
- Enz, R. y Bormann, J. (1995) A single point mutation decreases picrotoxinin sensitivity of the human GABA receptor $\rho 1$ subunit. *Neuroreport.* 6:1569-1572.
- Enz, R. y Cutting, G.R. (1999) GABA_C receptor ρ subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur. J. Neurosci.* 11:41-50.
- Enz, R. y Cutting, G.R. (1998) Molecular composition of GABA_C receptors. *Vis. Res.* 38:1431-1441.
- Enz, R., Brandstaetter, J.H., Waessle, H. y Bormann, J. (1996) Immunocytochemical localization of the GABA_C receptor ρ subunits in the mammalian retina. *J. Neurosci.* 16: 4479-4490.
- Enz, R., Brandstatter, J.H., Hartveit, E., Wassele, H.; y Bormann, J. (1995) Expression of GABA receptor $\rho 1$ and $\rho 2$ subunits in the retina and brain of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 7:1495-1501.
- Feigenspan, A. y Bormann, J. (1994) Differential pharmacology of GABA_A and GABA_C receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur. J. Pharm.* 288:97-104.

- Feigenspan, A. y Bormann, J. (1994) Modulation of GABA_C receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C. *J. Physiol.* **481**:325-30.
- Feigenspan, A., Wassle, H., y Bormann, J. (1993) Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. *Nature.* **361**:159-162.
- Fletcher, E.L., Koulen, P. y Wassle, H. (1998) GABA_A and GABA_C receptors on mammalian rod bipolar cells. *J. Comp. Neurol.* **396**:351-365.
- Fritschy, J.M., Benke D., Johnson, D.K., Mohler, H. y Rudolph, U. (1997) GABA_A-receptor α -subunit is an essential prerequisite for receptor formation *in vivo*. *Neurosci.* **81**:1043-1053.
- Garcia-Colunga, J. y Miledi R. (1997) Opposite effects of lanthanum on different types of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroreport.* **8**:3293-3296.
- Glatt, K., Glatt, H. y Lalande, M. (1997) Structure and organization of GABRB3 and GABRA5. *Genomics.* **41**:63-69.
- Greger, V., Knoll, J.H., Woolf, E., Glatt, K., Tyndale, R.F., DeLorey, T.M., Olsen, R.W., Tobin, A.J., Sikela, J.M. y Nakatsu, Y. (1995). The γ -aminobutyric acid receptor γ 3 subunit gene (GABRG3) is tightly linked to the α 5 subunit gene (GABRA5) on human chromosome 15q11-q13 and is transcribed in the same orientation. *Genomics.* **26**:258-264.
- Greka, A., Koolen, J.A., Lipton, S.A. y Zhang, D. (1998) Cloning and characterization of mouse GABA_C receptor subunits. *Neuroreport.* **9**:229-232.
- Gundersen, C.B., Miledi, R. y Parker, I. (1983a) Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. Royal Soc. Series B: Biological Sciences.* **219**:103-109.
- Gundersen, C.B., Miledi, R. y Parker, I. (1983b) Voltage-operated channels induced by foreign messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. Royal Soc. Series B: Biological Sciences.* **220**:131-140.

- Gundersen, C.B., Miledi, R. y Parker, I. (1984a) Glutamate and kainate receptors induced by rat brain messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. Royal Soc. Series B: Biological Sciences*, **221**:127-143.
- Gundersen, C.B., Miledi R. y Parker, I. (1984b) Messenger RNA from human brain induces drug- and voltage-operated channels in *Xenopus* oocytes. *Nature*. **308**:421-424.
- Gundersen, C.B., Miledi, R. y Parker, I. (1984c) Properties of human brain glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Royal Soc. London*. **221**:235-244.
- Hackam, A.S., Wang, T.L., Guggino, W.B. y Cutting, G.R. (1997) A 100 amino acid region in the GABA $\rho 1$ subunit confers robust homo-oligomeric expression. *Neuroreport*. **8**:1425-1430.
- Hackam, A.S., Wang, T.L., Guggino, W.B. y Cutting, G.R. (1997) The N-terminal domain of human GABA receptor $\rho 1$ subunits contains signals for homooligomeric and heterooligomeric interaction. *J. Biol. Chem.* **272**:13750-13757.
- Hampson, D.R., Theriault, E., Huang, X.P., Kristensen, P., Pickering, D.S., Franck, J.E. y Mulvihill, E.R. (1994) Characterization of two alternatively spliced forms of a metabotropic glutamate receptor in the central nervous system of the rat. *Neurosci.* **60**:325-336.
- Han, M.H., Li, Y. y Yang, X.L. (1997) Desensitizing GABA_C receptors on carp retinal bipolar cells. *Neuroreport*. **8**:1331-1335.
- Hanley, J.G., Koulen, P., Bedford, F., Gordon-Weeks, P.R. y Moss, S.J. (1999) The protein MAP-1B links GABA_C receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature*. **397**:66-69.
- Harvey, R.J., Chinchetru, M.A., y Darlison, M.G. (1994) Alternative splicing of a 51-nucleotide exon that encodes a putative protein kinase C phosphorylation site generates two forms of the chicken γ -aminobutyric acidA receptor $\beta 2$ subunit. *J. Neurochem.* **62**:10-16.
- Homanics, G.E., Harrison, N.L., Quinlan, J.J., Krasowski, M.D., Rick, C.E., de Blas, A.L., Mehta, A.K., Kist, F., Mihalek, R.M. y Aul, J.J. (1999) Normal electrophysiological and

- behavioral responses to ethanol in mice lacking the long splice variant of the $\gamma 2$ subunit of the γ -aminobutyrate type A receptor. *Neuropharmacology*. **38**: 253-265.
- Hosie, A.M. y Sattelle, D.B. (1996) Agonist pharmacology of two *Drosophila* GABA receptor splice variants. *Br. J. Pharm.* **119**:1577-1585.
- Huntsman, M.M., Tran; B.V., Potkin, S.G., Bunney, W.E. Jr. y Jones, E.G. (1998) Altered ratios of alternatively spliced long and short $\gamma 2$ subunit mRNAs of the γ -amino butyrate type A receptor in prefrontal cortex of schizophrenics. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**:15066-15071.
- Im, M.S. Hamilton, B.J., Carter, D.B. y Im W.B. (1992) Selective potentiation of GABA-mediated Cl^- current by lanthanum ion in subtypes of cloned GABA_A receptors. *Neurosci. Lett.* **144**:165-168.
- Im, W.B. Binder, J.A., Dillon, G.H., Pregenzer, J.F., Im, H.K. y Altman R.A. (1995) Acceleration of GABA-dependent desensitization by mutating threonine 266 to alanine of the $\alpha 6$ subunit of rat GABA_A receptors. *Neurosci. Lett.* **186**: 203-207.
- Imoto, K., Busch, C., Sakmann, B., Mishina, M., Konno, T., Nakai, J., Bujo, H., Mori, Y., Fukuda, K. y Numa, S. (1988) Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature*. **335**:645-648.
- Isomoto, S., Kaibara, M., Sakurai-Yamashita, Y., Nagayama, Y., Uezono, Y., Yano, K. y Taniyama, K. (1998) Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABA_B receptor. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **253**:10-15.
- Johnston, G.A. (1996) GABA_C receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharm. Sci.* **17**:319-323.
- Jones, A., Bahn S., Grant, A.L. Kohler, M. y Wisden, W. (1996) Characterization of a cerebellar granule cell-specific gene encoding the γ -aminobutyric acid type A receptor $\alpha 6$ subunit. *J. Neurochem.* **67**: 907-916.

- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H. y Froestl, W. (1997) Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*. 386:239-246.
- Kaupmann, K., Schuler, V., Mosbacher, J., Bischoff, S., Bittiger, H., Heid, J., Froestl, W., Leonhard, S., Pfaff, T. y Karschin, A. (1998) Human γ -aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 14991-14996.
- Kellenberger, S., Malherbe, P. y Sigel, E. (1992) Function of the $\alpha 1\beta 2\gamma 2\delta$ γ -aminobutyric acid type A receptor is modulated by protein kinase C via multiple phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 267:25660-25663.
- Korpi, E.R., Kuner, T., Kristo, P., Kohler, M., Herb, A., Luddens, H. y Seeburg, PH. (1994) Small N-terminal deletion by splicing in cerebellar $\alpha 6$ subunit abolishes GABA_A receptor function. *J. Neurochem.* 63:1167-1170.
- Kostrzewa, M., Kohler, A., Eppelt, K., Hellam, L., Fairweather, N.D., Levy, E.R. Monaco, A.P. y Muller, U. (1996) Assignment of genes encoding GABA_A receptor subunits $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 2$, and $\gamma 2$ to a YAC contig of 5q33. *Eur. J. Hum. Gen.* 4:199-204.
- Koulen, P., Brandstatter, J.H., Enz, R., Bormann, J. y Wassle, H. (1997) Synaptic clustering of GABA_C receptor ρ -subunits in the rat retina. *Eur. J. Neurosci.* 10:115-127.
- Koulen, P., Brandstatter, J.H., Kroeger, S., Enz, R., Bormann, J. y Waessle, H. (1997) Immunocytochemical localization of the GABA_C receptor ρ subunits in the cat, goldfish, and chicken retina. *J. Comp. Neuro.* 380: 520-532.
- Krasowski, M.D., Finn, S.E., Ye, Q. y Harrison, N.L. (1998) Trichloroethanol modulation of recombinant GABA_A, glycine and GABA $\rho 1$ receptors. *J. Pharm. Exp. Ther.* 284:934-942.
- Krieg, P.A. y Melton, D.A. (1984) Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nuc. Acids Res.* 12:7057-7070.

- Krishek, B.J., Moss, S.J. y Smart, T.G. (1996) A functional comparison of the antagonists bicuculline and picrotoxin at recombinant GABA_A receptors. *Neuropharmacology*, **35**:1289-1298.
- Kusama, T., Sakurai, M., Kizawa, Y., Uhl, G.R. y Murakami, H. (1995) GABA ρ 1 receptor: inhibition by protein kinase C activators. *Eur. J. Pharm.* **291**:431-434.
- Kusama, T., Spivak, C.E., Whiting, P., Dawson, V.L., Schaeffer, J.C. y Uhl, G.R. (1993) Pharmacology of GABA ρ 1 and GABA α/β receptors expressed in *Xenopus* oocytes and COS cells. *Br. J. Pharm.* **109**:200-206.
- Kusama, T., Wang, T.L., Guggino, W.B., Cutting, G. y Uhl, G.R. (1993) GABA ρ 2 receptor pharmacological profile: GABA recognition site similarities to ρ 1. *Eur. J. Pharm.* **245**:83-84.
- Lardelli, M. y Lendahl, U. (1994) Generating bacteriophage lambda sublibraries enriched for rare clones. *Biotechniques*. **16**:420-422.
- LaVallie, E. (1988) Expression and Purification of Maltose-Binding Protein Fusions. En: Current protocols in molecular biology. Editado por F. M. Ausubel. New York. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience 16.6.1-16.6.14.
- Leidenheimer, N.J., McQuilkin, S.J., Hahner, L.D., Whiting, P. y Harris, R.A. (1992) Activation of protein kinase C selectively inhibits the γ -aminobutyric acidA receptor: role of desensitization. *Mol. Pharm.* **41**:1116-1123.
- Lin, Y.F., Angelotti, T.P., Dudek, E.M., Browning, M.D. y Macdonald, R.L. (1996) Enhancement of recombinant α 1 β 1 γ 2L γ -aminobutyric acidA receptor whole-cell currents by protein kinase C is mediated through phosphorylation of both β 1 and γ 2L subunits. *Mol. Pharm.* **50**:185-95.
- Liu, Y. y Lasater, E.M. (1995) Characterization of GABA_A and GABA_C receptors in turtle retinal ganglion cells *Soc. Neurosci. Abstracts*. **21**: 355.

- Liu, Z.F., Kamatchi, G.L., Moreira, T., Mu, W. y Burt, D.R. (1998) The $\alpha 5$ subunit of the murine type A GABA receptor. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 59:84-89.
- Lopez, A.J. (1998) Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Ann. Rev. Gen.* 32:279-305.
- Lukasiewicz, P.D. y Shields, C.R. (1998) Different combinations of GABA_A and GABA_C receptors confer distinct temporal properties to retinal synaptic responses. *J. Neurophys.* 79:3157-3167.
- Lukasiewicz, P.D. y Wong, R.O. (1997) GABA_C receptors on ferret retinal bipolar cells: a diversity of subtypes in mammals? *Vis. Neurosci.* 14: 989-994.
- Lukasiewicz, P.D., Maple, B.R. y Werblin, F.S. (1994) A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina. *J. Neurosci.* 14:1202-1212.
- Luque, J.M., Bleuel, Z., Malherbe, P. y Richards, J.G. (1994) Alternatively spliced isoforms of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit I are differentially distributed within the rat spinal cord. *Neurosci.* 63:629-635.
- Machu, T.K., Mihic, S.J. y Dildy-Mayfield, J.E. (1998) Selective actions of a detergent on ligand-gated ion channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharm. Exp. Ther.* 284:32-36.
- Martinez-Torres, A., Vazquez, A.E., Panicker, M.M. y Miledi, R. (1998) Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the $\rho 1$ γ -aminobutyrate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 4019-4022.
- Matute, C. Pulakat, L. Rio, C., Valcarcel, C., Miledi, R. (1994) Properties of angiotensin II receptors in glial cells from the adult corpus callosum. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91:3774-3778.
- McDonald, B.J. y Moss, S.J. (1994) Differential phosphorylation of intracellular domains of γ -aminobutyric acid type A receptor subunits by calcium/calmodulin type 2-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269:18111-18117.

- McKinley, D.D., Lennon, D.J. y Carter, D.B. (1995) Cloning, sequence analysis and expression of two forms of mRNA coding for the human $\beta 2$ subunit of the GABA_A receptor. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 28:175-179.
- Miledi, R. (1982) A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Royal. Soc. London.* 215:491-497.
- Miledi, R., Parker, I. y Sumikawa, K. (1989) Transplanting receptors from brain into oocytes. En: Fidia Research Foundation Award Lectures. Raven Press. Nueva York. pp 57-90.
- Mileo, A.M., Monaco, L., Palma, E., Grassi, F., Miledi, R. y Eusebi, F. (1995) Two forms of acetylcholine receptor γ subunit in mouse muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92:2686-2690.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M. y Unwin N. (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J. Mol. Bio.* 288:765-786.
- Moss, S.J., Doherty, C.A. y Huganir, R.L. (1992a) Identification of the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylation sites within the major intracellular domains of the $\alpha 1$, $\gamma 2S$, and $\gamma 2L$ subunits of the γ -aminobutyric acid type A receptor. *J. Biol. Chem.* 267:14470-14476.
- Moss, S.J., Smart, T.G., Blackstone, C.D. y Huganir, R.L. (1992b) Functional modulation of GABA_A receptors by cAMP-dependent protein phosphorylation. *Science.* 257:661-665.
- Murata, Y., Woodward, R.M., Miledi, R. y Overman, L.E. (1996) The first selective antagonist for a GABA_C receptor *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 7:2073-2076.
- Narahashi, T., Ma, J.Y., Arakawa, O., Reuveny, E. y Nakahiro, M. (1994) GABA receptor-channel complex as a target site of mercury, -copper, zinc, and lanthanides. *Cell. Mol. Neurobio.* 14:599-621.
- Nelson, R., Schaffner, A.E., Li, Y.X. y Walton, M.K. (1999) Distribution of GABA_C-like responses among acutely dissociated rat retinal neurons. *Vis. Neurosci.* 16: 179-190.

- Ni, Y.G., Panicker, M.M. y Miledi, R. (1997) Efficient coupling of 5-HT_{1a} receptors to the phospholipase C pathway in *Xenopus* oocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **51**:115-122.
- Nicholls, J. G., Bruce, R.M. y Wallace, G. (1992) From neuron to brain: a cellular and molecular approach to the function of the nervous system. 3ra ed. Sunderland, Mass. Sinauer Associates.
- O'Hara, B.F., Andretic, R., Heller, H.C., Carter, D.B. y Kilduff, T.S. (1995) GABA_A, GABA_C, and NMDA receptor subunit expression in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **28**:239-250.
- Ogurusu, T., Eguchi, G. y Shingai, R. (1997) Localization of γ -aminobutyric acid (GABA) receptor $\rho 3$ subunit in rat retina. *Neuroreport.* **8**:925-927.
- Orser, B.A., McAdam, L.C., Roder, S. y MacDonald, J.F. (1998) General anaesthetics and their effects on GABA_A receptor desensitization. *Toxicology Lett.* **100**:217-24.
- Pearson, R.B. y Kemp, B.E. (1991) Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Meth. Enzym.* **200**:62-81.
- Pedrotti, B. e Islam, K. (1996) Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microfilaments. *Febs Letters.* **388**:131-133.
- Pedrotti, B., Ulloa, L., Avila, J. e Islam, K. (1996) Characterization of microtubule-associated protein MAP1B: phosphorylation state, light chains, and binding to microtubules. *Biochem.* **35**:3016-3023.
- Picard, V., Ersdal-Badju, E., Lu, A. y Bock S.C. (1994) A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase *Nucl. Acids. Res.* **22**:2587-2591.
- Polenzani, L., Woodward, R.M. y Miledi, R. (1991) Expression of mammalian γ -aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**:4318-4322 (1991).

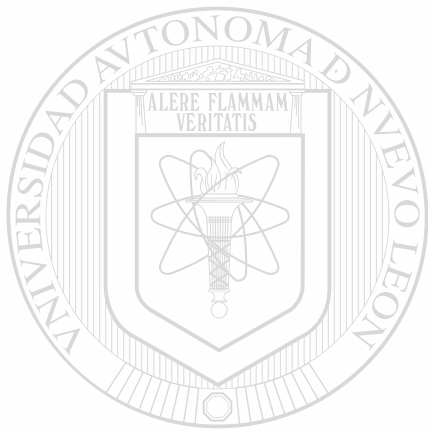
- Pritchett, D.B., Sontheimer, H., Gorman, C.M., Kettenmann, H., Seeburg, P.H. y Schofield, P.R. (1988) Transient expression shows ligand gating and allosteric potentiation of GABA_A receptor subunits. *Science*. 242:1306-1308.
- Qian, H. y Dowling, J.E. (1993) Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature*, 361:162-164.
- Qian, H. y Dowling, J.E. (1994) Pharmacology of novel GABA receptors found on rod horizontal cells of the white perch retina *J. Neurosci.* 14:4299-4307.
- Qian, H. y Dowling, J.E. (1995) GABA_A and GABA_C receptors on hybrid bass retinal bipolar cells. *J. Neurophys.* 74:1920-1928.
- Qian, H., Dowling, J.E. y Ripps, H. (1998) Molecular and pharmacological properties of GABA_ρ subunits from white perch retina. *J. Neurobio.* 37:305-320.
- Qian, H., Hyatt, G., Schanzer, A., Hazra, R., Hackam, A.S., Cutting, G.R. y Dowling J.E. (1997) A comparison of GABA_C and ρ subunit receptors from the white perch retina. *Vis. Neurosci.* 14:843-851.
- Ragozzino, D., Woodward, R.M., Murata, Y., Eusebi, F., Overman, L.E. y Miledi, R. (1996) Design and *in vitro* pharmacology of a selective γ -aminobutyric acid C receptor antagonist. *Mol. Pharm.* 50:1024-1030.
- Revah, F., Bertrand, D., Galzi, J.L., Devillers-Thiery, A., Mulle, C., Hussy, N., Bertrand, S., Ballivet, M. y Changeux, J.P. (1991) Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature*. 353:846-849.
- Ruiz, A., Borrego, S., Marcos, I. y Antinolo, G. (1998) A major locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on 6q, determined by homozygosity mapping of chromosomal regions that contain γ -aminobutyric acid-receptor clusters. *Am. J. Hum. Gene.* 62:1452-1459

- Russek, S.J. y Farb D.H. (1994) Mapping of the $\beta 2$ subunit gene (GABRB2) to microdissected human chromosome 5q34-q35 defines a gene cluster for the most abundant GABA_A receptor isoform. *Genomics*, 23:528-533.
- Russek, S.J. (1999) Evolution of GABA_A receptor diversity in the human genome. *Gene*. 227:213-222.
- Salceda, R., Vazquez, A.E. y Miledi, R. (1993) Expression of GABA_A receptor mRNA in the vertebrate retina. (23rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, D.C., USA, November 7-12, 1993) Society for Neuroscience Abstracts.19: 91.
- Sambrook, J. Fritsch, T. y Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2da ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor EUA.
- Schofield, P.R., Pritchett, D.B., Sontheimer, H., Kettenmann, H. y Seeburg, PH. (1989) Sequence and expression of human GABA_A receptor $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits *Febs Lett.* 244:361-364.
- Shimada, S., Cutting, G. y Uhl, G.R. (1992) γ -Aminobutyric acid A or C receptor? γ -Aminobutyric acid $\rho 1$ receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive γ -aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharm.* 41:683-687.
- Shingai, R., Yanagi, K., Fukushima, T., Sakata, K. y Ogurusu, T. (1996) Functional expression of GABA $\rho 3$ receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Res.* 26:387-390.
- Singer, M. y Berg, P. (1991) Genes & genomes: a changing perspective. Mill Valley, Calif. EUA: University Science Books.
- Sinnott, D., Wagstaff, J., Glatt, K., Woolf, E., Kirkness, E.J. y Lalande, M. (1993) High-resolution mapping of the γ -aminobutyric acid receptor subunit $\beta 3$ and $\alpha 5$ gene cluster on chromosome 15q11-q13, and localization of breakpoints in two Angelman syndrome patients. *Am. J. Hum. Gen.* 52:1216-1229.

- Strata, F. y Cherubini, E. (1994) Transient expression of a novel type of GABA response in rat CA3 hippocampal neurones during development. *J. Physiol.* **480**: 493-503.
- Sumikawa, K., Parker, I. y Miledi, R. (1984) Messenger RNA from rat brain induces noradrenaline and dopamine receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc. Royal Soc. London. Series B: Biological Sciences.* **223**:255-260.
- Swaroop, A. y Weissman, S.M. (1988) Charon BS(+) and (-), versatile λ phage vectors for constructing directional cDNA libraries and their efficient transfer to plasmids. *Nuc. Acids Res.* **16**: 8739.
- Swope, S.L., Moss, S.J., Blackstone, C.D. y Huganir, R.L. (1992) Phosphorylation of ligand-gated ion channels: a possible mode of synaptic plasticity. *FASEB J.* **6**: 2514-2523.
- Tia, S., Wang, J.F., Kotchabhakdi, N. y Vicini, S. (1996) Distinct deactivation and desensitization kinetics of recombinant GABA_A receptors. *Neuropharmacology.* **35**:1375-1382.
- Tigyi, G., Dyer, D., Matute, C. y Miledi, R. A serum factor that activates the phosphatidylinositol phosphate signaling system in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:1521-1525.
- Ueno, S., Bracamontes, J., Zorumski, C., Weiss, D.S. y Steinbach, J.H. (1997) Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABA_A receptor. *J. Neurosci.* **17**:625-634.
- Unwin, N. (1995) Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature.* **373**:37-43.
- Unwin, N. (1996) Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the α subunits. *J. Mol. Biol.* **257**:586-596.
- Unwin, N. (1998) The nicotinic acetylcholine receptor of the *Torpedo* electric ray. *Structural Biol.* **121**:181-90.

- Wang, T.L., Guggino, W.B. y Cutting, G.R. (1994) A novel γ -aminobutyric acid receptor subunit ($\rho 2$) cloned from human retina forms bicuculline-insensitive homooligomeric receptors in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 14:6524-6531.
- Wang, T.L., Hackam, A., Guggino, W.B. y Cutting, GR. (1995) A single histidine residue is essential for zinc inhibition of GABA $\rho 1$ receptors *J. Neurosci.* 15: 7684-7691.
- Wang, Z. y Grabowski, P.J. (1996) Cell- and stage-specific splicing events resolved in specialized neurons repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart. *RNA.* 3:996-1015.
- White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M. y Marshall, F.H. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA β receptor. *Nature.* 396:679-682.
- Whiting, P.J., McAllister, G., Vassilatis, D., Bonnert, T.P., Heavens, R.P., Smith D.W., Hewson, L., O'Donnell, R., Rigby, M.R. y Sirinathsingji, D.J. (1997) Neuronally restricted RNA splicing regulates the expression of a novel GABA α receptor subunit conferring atypical functional properties. *J. Neurosci.* 17:5027-5037.
- Woodward, R.M., Polenzani, L. y Miledi, R. (1992a) Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive γ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. I. Effects of Cl $^-$ channel inhibitors. *Mol. Pharm.* 42:165-73
- Woodward, R.M., Polenzani, L. y Miledi, R. (1992b) Effects of hexachlorocyclohexanes on γ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes by RNA from mammalian brain and retina. *Mol. Pharm.* 41:1107-1115.
- Woodward, R.M., Polenzani, L. y Miledi, R. (1992c) Effects of steroids on γ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes by poly(A) $^+$ RNA from mammalian brain and retina. *Mol. Pharm.* 41:89-103.

- Woodward, R.M., Polenzani, L. y Miledi, R. (1993) Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (ρ -like) γ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of γ -amino butyric acidA and γ -amino butyric acidB receptor agonists and antagonists. *Mol. Pharm.*, 34:609-25.
- Wu, F.S., Gibbs T.T. y Farb D.H. (1993) Dual activation of GABA_A and glycine receptors by β -alanine: inverse modulation by progesterone and 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *Eur. J. Pharm.* 246:239-246.
- Xue, H. (1998) Identification of major phylogenetic branches of inhibitory ligand-gated channel receptors. *J. Mol. Evol.* 47:323-333.
- Yeh, H.H., Grigorenko, E.V. y Veruki M.L. (1996) Correlation between a bicuculline-resistant response to GABA and GABA_A receptor $\rho 1$ subunit expression in single rat retinal bipolar cells. *Vis. Neurosci.* 13:283-292.
- Zhang, D., Pan, Z.H., Zhang, X., Brideau, A.D. y Lipton S.A. (1997) Cloning of a γ -aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92:11756-11760.
- Zhang, L. Ashiya, M., Sherman, T.G. y Grabowski P.J. (1996) Essential nucleotides direct neuron-specific splicing of $\gamma 2$ pre-mRNA. *RNA.* 2:682-698.
- Zhang, L., Liu, W. y Grabowski P.J. (1999) Coordinate repression of a trio of neuron-specific splicing events by the splicing regulator PTB. *RNA.* 5:117-130.
- Zhu, W.J., Wang, J.F., Corsi, L. y Vicini S. (1998) Lanthanum-mediated modification of GABA_A receptor deactivation, desensitization and inhibitory synaptic currents in rat cerebellar neurons. *J. Physio.* 511:647-661.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



