

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---



---

---

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**MAESTRIA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**“CO-EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES GABA<sub>A</sub>  $\gamma$ 2 Y GABA<sub>C</sub>  $\rho$ 1: ESTUDIO  
FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN  $\gamma$ 2K289M ASOCIADA A EPILEPSIA GENERALIZADA  
Y CONVULSIONES FEBRILES PLUS (GEFS+)”.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
Q.F.B. FLOR DE MARIA TREJO MEDINILLA**

**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES**

**Campus Juriquilla, Querétaro. Junio 2005**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*Detrás de cada línea de llegada hay una partida.  
Detrás de cada logro hay otro desafío. Mientras  
Estés vivo, siéntete vivo.  
Si extrañas lo que hacías, vuelve a hacerlo. No  
Vivas de fotos amarillas.*

*Agnes Gonxha Bojaxhiu*

*Cuando quieres alguna cosa, todo el Universo  
Conspira para que realices tu deseo.*

*El Alquimista. Paulo Coelho.*

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Dios, por cada momento de mi vida. Por cada enseñanza adquirida.

A mi madre y hermano, por su apoyo y su amor. No lo hubiera logrado sin ustedes.

A Ataúlfo, por toda su paciencia y por ser un gran tutor y amigo.

A la familia Halliwell y a Leanne Coyne por todo su apoyo para lograr mi trabajo. Por su hospitalidad.

A mis amigos, por su confianza y amistad limpia. Por los lejanos y cercanos. Por todos aquellos que no me olvidaron.

A mi luna menguante ... todo mi amor.

- \* Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
Becario No: 176213
  
- \* A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM  
Becario No: 503011080
  
- \* Biblioteca:  
Bib. Pilar Galarza Barrios  
Bib. Rafael Silva Cruz
  
- \* Biología Molecular:  
Dra. Añadí Antaramian Salas
  
- \* Enseñanza:  
Quím. Leonor Casanova Rico.

## ÍNDICE GENERAL

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	4
<b>INDICE DE TABLAS</b>	5
<b>RESUMEN</b>	6
<b>ABSTRACT</b>	8
<b>INTRODUCCIÓN</b>	10
<b>ANTECEDENTES</b>	13
Receptores GABA <sub>A</sub>	13
Receptores GABA <sub>C</sub>	17
Epilepsia	19
Epilepsia Generalizada con Ataques Febriles	21
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	25
<b>HIPÓTESIS</b>	27
<b>OBJETIVOS</b>	28
Objetivo General	28
Objetivos Específicos	28
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	29
Distribución de Receptores GABA <sub>A</sub> Y GABA <sub>C</sub> en el SNC	29
Disección y toma de muestras	29
Extracción de RNA total	29
RT-PCR	30
Electroforesis en geles de agarosa	32
Inmunohistoquímica	32
Mutagénesis sitio Dirigida	34
Clonación de productos de PCR	38
Clonación del gen $\gamma$ 2K289M en el vector pCR4TOPO	39
Transformación por choque térmico	39
Minipreparación: extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina	40
Caracterización de las clonas recombinantes obtenidas	41
Subclonación Molecular de Receptores GABA <sub>A</sub> y GABA <sub>C</sub>	42
Secuenciación	42

Cultivo celular	46
Subcultivo en células HEK293	47
Transfección de células	48
Registros electrofisiológicos	49
<b>RESULTADOS</b>	50
Distribución de las subunidades $\rho 1$ y $\gamma 2$ en el SNC humano	50
Inmunohistoquímica	53
Mutagénesis sitio dirigida por la reacción en cadena de la polimerasa	55
Caracterización del plásmido $\gamma 2K289M$ -pCR4TOPO	55
Secuenciación	56
Caracterización funcional de receptores GABA <sub>A</sub> silvestre y mutante en ovocitos de <i>X. laevis</i>	56
Caracterización funcional de receptores $\rho 1\gamma 2L$ y $\rho 1\gamma 2K289M$ en células HEK293	57
<b>DISCUSIÓN</b>	63
<b>CONCLUSIONES</b>	66
<b>REFERENCIAS</b>	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Conformación de los receptores GABA <sub>A</sub> y GABA <sub>C</sub>	14
2	Topología general de las subunidades de los receptores GABA <sub>A</sub> y GABA <sub>C</sub>	15
3	Conservación evolutiva del residuo de lisina en GABRG2	22
4	Efecto de la mutación $\gamma$ 2K289M sobre las corrientes generadas por GABA en ovocitos de <i>X. laevis</i>	23
5	Esquema de la estrategia para la mutación sitio dirigida en la subunidad $\gamma$ 2	35
6	Construcción de los vectores recombinantes	44
7	Fotografía de cultivo de células HEK293	46
8	Fotografía de electroforesis en el gel de agarosa donde se muestran los RNA totales de distintas áreas del SNC	50
9	Fotografía de productos de RT-PCR de distintas áreas del SNC para $\gamma$ 2 y $\rho$ 1	52
10	Fotografía de inmunodetecciones realizadas en cerebelo	54
11	Fotografía de un gel de agarosa mostrando los productos de PCR para la subunidad $\gamma$ 2 mutada y ligación	55
12	Fotografía de un gel de agarosa mostrando la digestión de $\gamma$ 2K289M-pCR4TOPO con NcoI	55
13	Electroforetograma mostrando la mutación en $\gamma$ 2	56
14	Corrientes generadas por GABA en ovocitos de <i>X. laevis</i> inyectados con receptores GABA <sub>A</sub>	56
15	Caracterización de la cinética de los receptores $\rho$ 1 $\gamma$ 2, $\rho$ 1 $\gamma$ 2K289M y $\rho$ 1	57
16	Relación Dosis-Respuesta de GABA	60
17	Cinética de Desactivación	61
18	Caracterización farmacológica para los receptores $\rho$ 1 $\gamma$ 2, $\rho$ 1 $\gamma$ 2K289M y $\rho$ 1	62

## INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Pág
1	Secuencias de oligonucleótidos para RT-PCR 1	31
2	Secuencias de oligonucleótidos para RT-PCR 2	35
	Condiciones de PCR para obtener el gen mutante.	
3	Mezcla de reacción	36
4	Condiciones de PCR	36
5	Condiciones para la reacción de ligación	37
	Condiciones de PCR para reamplificación	
6	Mezcla de reacción	38
7	Condiciones de PCR	38
8	Reacción de Ligación usada en la construcción del vector $\gamma$ 2K289M	39
9	Reacción de digestión $\gamma$ 2K289M-pCR4TOPO con EcoRI	41
10	Secuencia de oligonucleótidos para caracterización	41
	Condiciones de PCR para caracterización	
11	Mezcla de reacción	42
12	Condiciones de PCR	42
13	Secuencia de oligonucleótidos para secuenciación	43
14	Reacción de digestión para el vector pCDNA3	44
15	Reacción de digestión para la clona $\gamma$ 2K289M-pCR4TOPO	45
16	Reacción de digestión para la clona $\gamma$ 2R43Q-pGEMT	45
17	Reacción de ligación $\gamma$ 2K289M-pCDNA3	45
18	Reacción de digestión para caracterización del gen $\gamma$ 2K289M	46
19	Análisis espectrofotométrico de muestras de RNA total	51

## RESUMEN

La epilepsia es uno de los problemas neurológicos más comunes en el mundo. Aunque la mayoría de las epilepsias generalizadas tienen patrones de herencia complejos, algunas tienen un patrón de herencia mendeliano asociadas con mutaciones genéticas simples. Muchas de estas mutaciones han sido encontradas en genes que codifican para canales iónicos.

Recientemente se reportaron algunas mutaciones del receptor GABA<sub>A</sub> que están ligadas a epilepsia familiar en humanos. Análisis funcionales de receptores GABA<sub>A</sub> ( $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ) expresados en *Xenopus laevis* sugieren que la mutación R43Q de la subunidad  $\gamma 2$  confiere menor sensibilidad al diazepam e inactivación del receptor y que la mutación  $\gamma 2$  K289M decrece la amplitud de corrientes generadas por GABA y la inactivación del receptor.

Por otra parte, aunque está bien establecido que los receptores GABA<sub>C</sub> están formados por subunidades tipo  $\rho$ , la composición exacta y número de subunidades del receptor *in vivo* aun no se conoce. Algunos estudios indican que la subunidad  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> humano co-ensambla con la subunidad  $\rho 1$  para formar un receptor hetero-oligomérico.

La distribución de las subunidades  $\rho$  del receptor GABA<sub>C</sub> en el sistema nervioso central permanece en controversia, a diferencia del receptor GABA<sub>A</sub> que se encuentra ampliamente distribuido en el SNC.

Nosotros hemos investigado la expresión del RNAm de las subunidades  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> y  $\rho 1$  del receptor GABA<sub>C</sub> en seis regiones del SNC, las cuales son susceptibles a lesiones en pacientes epilépticos, encontrándose co-distribuidos únicamente en cerebelo y núcleo caudado. Con el fin de determinar si las subunidades se expresan en el mismo tipo celular se realizaron inmunodetecciones en cortes coronales de cerebelo humano, donde se localizaron distribuidas en la línea de células Purkinje.

Por otra parte, estudiamos las características funcionales de receptores formados por el ensamble de ambas subunidades utilizando tanto la subunidad  $\gamma 2$  silvestre como la subunidad mutada K289M en células HEK293. Encontramos que la asociación  $\rho 1$ -  $\gamma 2$ K289M provoca un decremento en la amplitud de las corrientes generadas por GABA. Estos receptores son bloqueados por bicuculina. También presentan una cinética de desactivación rápida. Por tanto, pudiesen estar implicados fisiológicamente en una inhibición de la inhibición provocada por estos receptores.

## ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common neurological problems in the world. Though most of the generalized epilepsies have a complex pattern of inheritance, some of them have a Mendelian pattern of inheritance associated with genetic mutations. Many of these mutations have been found in genes that encode for ionic channels.

Recently, some mutations of the GABA<sub>A</sub> receptor were linked to epilepsy in humans. Functional analyses of GABA<sub>A</sub> receptors ( $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ) expressed in *Xenopus laevis* suggest that the mutation  $\gamma 2$  K289M decreases the amplitude of currents generated by GABA and the deactivation rate of the receptor.

On the other hand, though it is well established that GABA<sub>C</sub> receptors are formed by  $\rho$  subunits, the exact composition and number of subunits of the receptor *in vivo* is unknown. Some studies indicate that the subunit  $\gamma 2$  of the human GABA<sub>A</sub> receptor co-assemble with the subunit  $\rho 1$  to form a hetero-oligomeric receptor.

The distribution of  $\rho$  subunits of the GABA<sub>C</sub> receptor in the central nervous system (CNS) remains in controversy, unlike the GABA<sub>A</sub> receptor that is widely distributed in the CNS.

We have investigated the expression of the RNAm of  $\gamma 2$  subunits of the GABA<sub>A</sub> receptor and  $\rho 1$  of the GABA<sub>C</sub> receptor in six regions of the CNS, which are altered in epileptic patients.  $\rho 1$  and  $\gamma 2$  were co-distributed in cerebellum and caudate . In order to determine if the subunits express in the same cell type immunodetections were performed in human cerebellum, where were expressed along the Purkinje cell line.

Finally, we studied the functional characteristics of receptors formed by the assembly of both subunits using  $\gamma 2$  wild type as well as the mutant subunit K289M. We find that the association  $\rho 1-\gamma 2$  K289M produces a decrease in the amplitude of the currents generated by GABA in contrast with the wild type receptor. The

kinetics of the receptor is different between these receptors since the receptor  $\rho 1\gamma 2$  K289M presents two phases of deactivation, a fast phase of decay and a second of slower deactivation. This mutant receptor could be involved in some type of pathology where it could cause the inhibition of the inhibition in the CNS causing imbalance in the conduction of the nerve impulse.

### Objetives

To study the functional properties of the chimeric receptors  $GABA_A/GABA_C$  including the mutation K289M of the subunit  $\gamma 2$ .

### Methods

The presence of the subunits  $\rho 1$  and  $\gamma 2$  was determined by RT-PCR technique for the cortex (frontal, prefrontal, temporal, and parietal), caudate, cerebellum, hippocampus, and thalamus. We used Immunohistochemistry to determine the presence of these subunits in cerebellum. Whole Cell Patch Clamp was used to measure the currents induced by GABA in cells HEK293 transfected with the subunits  $\rho 1$  and  $\gamma 2$  either wild type or mutant.

### Conclusions

- The transcripts for the subunits  $\rho 1$  and  $\gamma 2$  are present in the human cerebellum and caudate.
- The transcripts for the subunits  $\rho 1$  and  $\gamma 2$  form heteromeric receptors when they are expressed in cells HEK293.
- These subunits present alterations in the deactivation kinetics when the subunit  $\gamma 2$  is mutated in K289.

## INTRODUCCIÓN

Las señales eléctricas son críticas para el funcionamiento de neuronas, células musculares y miocitos cardiacos. Las proteínas que regulan las señales eléctricas en estas células, incluyendo canales iónicos dependientes de voltaje y neuroreceptores son candidatos obvios en los cuales mutaciones en el DNA que los codifica podrían conducir a problemas en la transmisión sináptica (Félix et al, 2000)

En el sistema nervioso central (SNC), los receptores para el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) son los responsables de los efectos inhibitorios de la neurotransmisión. Existen tres familias de receptores del GABA: las familias GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> son receptores ionotrópicos encargados de la inhibición sináptica rápida, mientras que los receptores GABA<sub>B</sub>, son receptores metabotrópicos asociados a proteínas G, que acoplan a canales de potasio y de calcio (Bormann, 2000). Por muchas décadas se ha sugerido que la interrupción de la transmisión GABAérgica está directamente involucrada en la epilepsia. Recientemente, en estudios clínicos en una familia en la que los individuos exhiben epilepsia de ausencia infantil y ataques febriles, se han identificado mutaciones en el gen GABRG2, el cual codifica para la subunidad  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> (Wallace et al, 2001; Kananura et al, 2002). En estudios similares, este gen también ha sido asociado a un tipo de epilepsia cuyos individuos presentan epilepsia generalizada con ataques febriles “plus” (GEFS+) (Baulac et al, 2001; Harkin, et al, 2002).

Por otra parte, aunque está bien establecido que los receptores GABA<sub>C</sub> son formados por subunidades tipo  $\rho$ , la composición exacta y número de subunidades del receptor *in vivo* aún no se conoce (Qian et al, 2002). Algunos estudios indican que la subunidad  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> humano se co-ensambla con la subunidad  $\rho 1$  para formar un receptor heteroligomérico (Qian et al, 1999), e incluso con las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del receptor a glicina (Pan et al, 2000). Las subunidades  $\rho$  y los receptores GABA<sub>A</sub> tienen un alto grado de similitud en la secuencia aminoacídica de las regiones que supuestamente son responsables de

la oligomerización, lo que permite interacciones funcionales proteína–proteína entre las subunidades  $\gamma 2$  y  $\rho 1$  (Ekema et al, 2002).

En la retina de los vertebrados las subunidades  $\rho$  y las del receptor  $GABA_A$  han sido localizadas en el mismo tipo celular: la célula bipolar (Enz et al, 1995). La distribución celular de las subunidades  $\rho 1$  y  $\rho 2$  del receptor  $GABA_C$  en el SNC de la rata permanece en controversia, pero se han encontrado sus transcritos en cerebelo, hipocampo y médula espinal (Enz et al, 1995). Además se han localizado los RNAm de  $\rho 1$  y  $\rho 2$  en las células de Purkinje y de Golgi del cerebelo (Martinez Torres, 2000). En el hipocampo se han encontrado estas subunidades en la capa CA1 piramidal, giro dentado e interneuronas (Rozzo et al, 2002).

Las lesiones que con mayor frecuencia se observan en pacientes epilépticos ya sea con afección simple o combinada, y en uno o ambos hemisferios cerebrales, se localizan en la región del Asta de Ammon del hipocampo, en el cerebelo y el tálamo (Feria et al, 1997). Otras áreas susceptibles son la región del borde de la hoz del cerebro, la circunvolución del cíngulo, algunas circunvoluciones del lóbulo frontal adyacentes a la línea media y algunas regiones del cuerpo estriado (Feria et al, 1997). Otros estudios indican que los mecanismos que generan ataques de ausencia involucran alteraciones en el circuito entre el tálamo y la corteza cerebral (Chang et al, 2003). Por tanto, sería interesante saber si los receptores  $GABA_C$  al igual que los  $GABA_A$  se co-ensamblan en algunas regiones cerebrales directamente afectadas en pacientes epilépticos.

En lo referente al ensamble intersubunidades de receptores  $GABA$ , se ha identificado una región N-terminal de 70 aminoácidos en la subunidad  $\rho 1$  que contiene las secuencias para el ensamble homooligomérico (Enz y Cutting, 1999). En estudios previos se sugirió que en ensayos de expresión heteróloga la subunidad  $\gamma 2$  del receptor  $GABA_A$  humano co-ensambla con la subunidad  $GABA_\rho$  ( $\rho 1B$ ) de la perca blanca para formar un receptor heterooligomérico con propiedades distintas: las corrientes generadas por GABA tienen cinética rápida y

son sensibles a la modulación de pentobarbital (Qian, et al., 2002). Estas respuestas pueden ser eliminadas por una sola mutación en el tercer dominio transmembranal de la subunidad  $\gamma 2$ , indicando que la sensibilidad a pentobarbital es mediada por la subunidad  $\gamma 2$  incorporada en un receptor heteromérico. Por otra parte, las subunidades  $\rho 1$  y  $\gamma 2$  fueron detectadas en lisados de cerebro de rata adulta y médula espinal que habían sido precipitados previamente con anticuerpos específicos contra estas subunidades, sugiriendo su interacción física en otras áreas del SNC (Ekema et al, 2002).

En este trabajo mostramos la existencia de una co-distribución en el SNC humano de los transcritos que codifican para las subunidades  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> y  $\rho 1$  del receptor GABA<sub>C</sub>. Posteriormente estudiamos *in vitro* las características funcionales de receptores formados por el ensamble de ambas subunidades utilizando tanto la subunidad  $\gamma 2$  silvestre como la subunidad mutada en el sitio asociado a GEFS+.

## ANTECEDENTES

### Receptores GABA<sub>A</sub>

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es uno de los principales neurotransmisores inhibitorios en el SNC de los vertebrados. GABA activa tres diferentes clases de receptores: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>. Los receptores GABA<sub>A</sub> son ionotrópicos permeables al ión cloro. Estos receptores son activados por GABA, muscimol e isoguavacina, y son inhibidos por bicuculina y gabazina. Los receptores GABA<sub>B</sub> son activados por GABA, baclofeno, ácido 4-amino-3-(5-cloro-2-tienil) butanóico y ácido 3-aminopropil-(metil)-fosfínico, y son inhibidos por baclofeno, faclofeno, saclofeno y 2-hidroxisaclofeno. Estos receptores se sabe que están acoplados a canales de  $Ca^{2+}$  o  $K^+$  a través de proteínas G para activar sistemas de segundos mensajeros en la célula. Los receptores GABA<sub>C</sub> son derivados de tres formas de la subunidad  $\rho$ , y son ionotrópicos permeables a cloro. Estos receptores son activados por GABA y algunos análogos de GABA tales como el ácido cis-4-aminocrotónico (CACA) y el ácido trans 4-aminocrotónico (TACA), y son inhibidos por el ácido imidazol-4-acético y el ácido [(1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il)] metilfosfínico (TPMPA) pero es insensible a bicuculina, barbitúricos, benzodiazepinas y baclofeno (Metha et al, 1999, Woodward, R. et al, 1992).

El receptor GABA<sub>A</sub> es una proteína transmembranal heterooligomérica el cual es expresado en el SNC y periférico. Las secuencias aminoacídicas de las subunidades que lo forman muestran una identidad significativa (20 a 30%) con otros canales ionotrópicos tales como el receptor nicotínico a acetilcolina, receptor a glicina y receptor 5-HT<sub>3</sub> (Metha et al, 1999).

El receptor funciona como un heteropentámero (Nayeem et al., 1994) consistiendo de varias subunidades incluyendo  $\alpha(1-6)$ ,  $\beta(1-3)$ ,  $\gamma(1-3)$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\delta$ , y  $\pi$  (Fig 1), y varias subunidades tienen varios subtipos derivados de eventos de "splicing alternativos" (Whiting et al, 1990; Harvey et al, 1994; Jin et al, 2004).

La distribución de las subunidades ha sido investigada en varias regiones del SNC. Por ejemplo, la subunidad  $\alpha 1$  está presente predominantemente en el cerebelo, mientras que en el hipocampo los niveles son más bajos (Metha et al., 1999). En contraste, las subunidades  $\alpha 2-5$  están presentes predominantemente en el hipocampo, mientras que en el cerebelo no se han registrado. La corteza cerebral tiene niveles intermedios de subunidades  $\alpha 1-4$  y bajos niveles de la subunidad  $\alpha 5$ . La subunidad  $\alpha 6$  está presente en las células granulares cerebelares, mientras que el hipocampo y corteza cerebral carecen de esta subunidad. La distribución relativa de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 3$  es la siguiente: hipocampo > corteza > cerebelo; mientras los niveles para  $\beta 2$  es cerebelo > corteza > hipocampo. Interesantemente, el RNAm de la subunidad  $\gamma 1$  es expresado predominantemente en amígdala y septum, en contraste a la mayoría de las subunidades del receptor  $GABA_A$  son expresadas principalmente en la corteza cerebral y cerebelo. La subunidad  $\gamma 2$  está presente en cantidades abundantes en casi cada región del cerebro, mientras que al subunidad  $\gamma 3$  está presente principalmente en la corteza y núcleos basales. La subunidad  $\delta$  está presente predominantemente en cerebelo, mientras que el hipocampo y corteza tienen bajos niveles de esta subunidad. El RNAm de la subunidad  $\varepsilon$  está presente en amígdala, tálamo y núcleo subtalámico. La subunidad  $\pi$  ha sido reportada en pulmón, timo, próstata y útero (Metha et al., 1999)

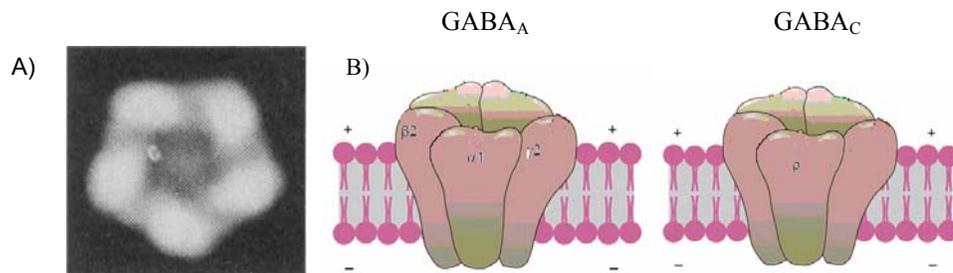


Figura 1. **Conformación de los receptores  $GABA_A$  Y  $GABA_C$ .** A) Imagen de microscopía electrónica del receptor  $GABA_A$  (Nayeem et al, 1994) y B) dibujo esquemático ilustrando la composición molecular pentamérica de los receptores  $GABA_A$  Y  $GABA_C$

Cada subunidad tiene un dominio extracelular N-terminal, cuatro dominios transmembranales y, una pequeña cola C-terminal extracelular (Fig.2) (Olsen y Tobin, 1990). El factor que determina las características farmacológicas y fisiológicas es la combinación de subunidades que forman al receptor (Barnard et al; 1998; Boileau et al., 2003). La mayoría de los receptores nativos contienen subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ , siendo  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  la combinación más común (Bowser et al, 2002; Hirose et al., 2003). Sin embargo la composición de subunidades es altamente variable y en muchos de los casos aún no se determina en neuronas nativas (Milligan et al; 2004). El receptor tiene dos sitios de unión a GABA formados por los dominios extracelulares en la interfase de las subunidades  $\alpha\beta$  (Bowser et al., 2002). El receptor también es modulado alostéricamente por benzodiazepinas, y se piensa que éstas se unen en la interfase formada por las subunidades  $\alpha\gamma$  (Bowser et al., 2002). La unión de las benzodiazepinas al receptor GABA<sub>A</sub> incrementa las corrientes de Cl<sup>-</sup> activadas por GABA, pero son incapaces de activar al receptor por sí solas. La subunidad  $\gamma 2$  es por mucho la subunidad más abundante y es requerida para la alta afinidad de unión de benzodiazepinas (Boileau et al., 2002). En ratones “Knock-out” de  $\gamma 2$ , los cuales mueren después de nacer, los sitios de unión a benzodiazepinas se reducen en un 90% aproximadamente (Rudolph y Möhler, 2004), de igual manera, ratones deficientes en esta subunidad presentan una reducción en la conductancia, probabilidad, y tiempo de apertura del canal.

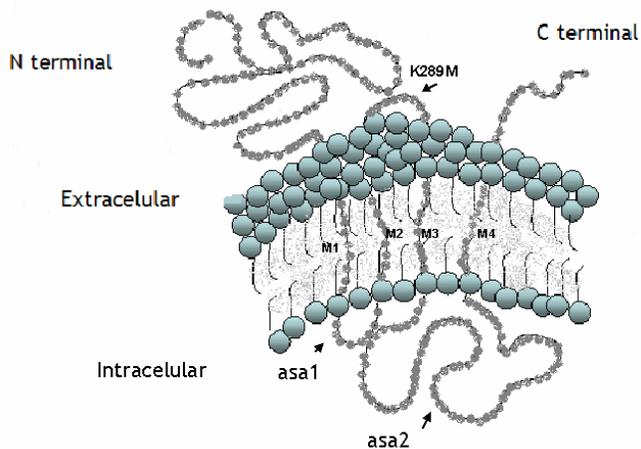


Figura 2. Estructura general de las subunidades de receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>. Representación esquemática de la subunidad  $\gamma 2$  y  $\rho$  mostrando la posición de la mutación K289M. Las subunidades de estos receptores están formadas por un dominio N- terminal, cuatro dominios transmembranales (M1-M4) y dos asas intracelulares.

La subunidad  $\beta 3$  forma receptores homoméricos funcionales; lo que contrasta con las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  ó  $\gamma 2$ , las cuales no alcanzan la superficie celular cuando se expresan independientemente en células en cultivo. Además, las subunidades homoméricas  $\beta 3$  generan corrientes espontáneas cuando son expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* ó células de mamífero en cultivo (Taylor et al.; 1999, Connolly et al.; 1996).

En estudios recientes se ha encontrado que la subunidad  $\gamma 2$  influye en la cinética de las fases rápidas de desensibilización y desactivación del receptor (Boileau et al., 2003). Esta subunidad es también requerida para la localización sináptica y agrupamiento de receptores GABA<sub>A</sub> no solamente durante el desarrollo sino también en sinapsis maduras. Existen estudios que confirman que la pérdida de la función de  $\gamma 2$  por mutaciones causa epilepsia (Schweizer et al., 2003). Como se mencionó anteriormente los receptores GABA<sub>A</sub> regulan la inhibición de la transmisión sináptica rápida en el SNC. Por tanto, la disfunción del receptor GABA<sub>A</sub> podría conducir a estados de hiperexcitabilidad neuronal, los cuales son eventos relacionados a la epileptogénesis (Bowser et al., 2002).

Por muchos años se sospechó que los síndromes epilépticos humanos podrían tener un componente genético. Sin embargo, sólo hasta la fecha se han determinado las bases moleculares de unas cuantas epilepsias de carácter hereditario. Algunos de los genes cuyas mutaciones conducen a formas hereditarias de epilepsias codifican para subunidades de canales iónicos, como el receptor GABA<sub>A</sub> (Bowser et al, 2002).

Existen trabajos que muestran que la inhibición de la expresión de la subunidad  $\gamma 2$  en el hipocampo de rata por medio de oligonucleótidos antisentido, se acompaña de ataques electrográficos espontáneos que evolucionan a status epilepticus límbicos profundos, que resultan posteriormente en cambios neurodegenerativos severos (Karle et al.; 1998)

### Receptores GABA<sub>C</sub>

Al igual que los receptores GABA<sub>A</sub>, los receptores GABA<sub>C</sub> son ionotrópicos. Los receptores GABA<sub>C</sub> son insensibles a bicuculina que es un antagonista específico de receptores GABA<sub>A</sub> y resistentes a baclofeno, el cual es un agonista del receptor GABA<sub>B</sub>. Estos receptores fueron definidos como una familia separada de los receptores GABA<sub>A</sub> por sus peculiares propiedades funcionales y farmacológicas además de su abundancia en la retina (Polenzani et al. 1991). Estos receptores son caracterizados por su alta afinidad a GABA, lenta cinética de activación e inactivación, baja tasa de desensibilización, largo tiempo de apertura del canal y conductancia de canal pequeña.

Los receptores GABA<sub>C</sub> están formados por subunidades llamadas rho ( $\rho$ ), se han identificado 3 genes que codifican para subunidades de este receptor:  $\rho1$ ,  $\rho2$  y  $\rho3$ . Para formar un receptor funcional las subunidades se agrupan en pentámeros **homooligoméricos** en la membrana plasmática (Fig. 1) (Chebib y Johnston 2000). La estructura general de cada subunidad consta de los siguientes dominios (Fig. 2): a) **Dominio N-terminal extracelular** en donde se localiza el sitio de unión al agonista, y un par de residuos de cisteínas que forman un asa intramolecular. b) **Cuatro dominios formados por residuos aminoácidos hidrofóbicos**, que forman regiones que están embebidas en la membrana celular. El segundo dominio transmembranal (TM2) es de gran importancia ya que forma la pared del canal iónico, c) **Dos asas intracelulares**. Una de ellas conecta el primer y segundo segmentos transmembranales y la segunda al tercer y cuarto dominios transmembranales. La segunda asa tiene señales de modificación postraduccional entre las cuales se encuentran aquellas para la fosforilación por la enzima proteína cinasa C. Además interactúa con proteínas estructurales que posiblemente “anclan” el receptor al sistema de microtúbulos (Hanley et al, 1999). La secuencia de la subunidad  $\rho1$  comparte 37% de identidad de secuencia con la subunidad  $\gamma2$  (Sarto et al., 2002)

La distribución celular de estos receptores se ha estudiado principalmente en la retina en donde se expresan en las células bipolares y horizontales (Feigenspan et al. 1993, Qian y Dowling 1993). Sin embargo, algunos estudios sugieren que los receptores GABA<sub>C</sub> se expresan en la corteza cerebral (O'Hara et al., 1995, Enz et al., 1995), e incluso en el cerebelo y la pituitaria (Cutting et al., 1991; Boue-Grabot et al, 1995, 1998). Además, existen indicios de que en estados tempranos del desarrollo del cerebelo, hipocampo y médula espinal de rata podrían existir receptores GABA<sub>C</sub> (Rozzo et al., 2002). Sin embargo, hasta ahora su distribución tisular y localización celular no han sido esclarecidas por completo.

Considerando que las subunidades  $\rho$  son expresadas en el SNC, las características de los receptores GABA en regiones que contienen subunidades  $\rho$  en combinación con GABA<sub>A</sub> frecuentemente no corresponden a receptores típicos GABA<sub>C</sub>, lo que sugiere que pudieran estar formados receptores quiméricos GABA<sub>A</sub>-GABA<sub>C</sub> (Milligan et al, 2004)

En interneuronas hipocampales, se han descrito respuestas a GABA con propiedades farmacológicas típicas mezcladas de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>. Las corrientes postsinápticas inhibitorias de estas interneuronas mostraban una reducida sensibilidad al antagonista picrotoxina cuando las comparaban con las presentadas en neuronas piramidales (Semyanov y Kullmann, 2002). Trabajos más recientes han descrito respuestas a GABA con propiedades farmacológicas mezcladas de receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> en células piramidales hipocampales en rebanadas de cerebro de rata (Hartmann et al, 2004). Por tanto, estos receptores comprenderían un tipo de receptor Ionotrópico GABA distinto que no puede ser establecido en ninguna de las familias establecidas.

## **EPILEPSIAS**

Los ataques epilépticos son inducidos por descargas eléctricas focales o generalizadas anormales en el SNC. El equilibrio en la comunicación entre neuronas es regulado por una red de circuitos excitatorios e inhibitorios. El aumento de los mecanismos excitatorios y el daño de los inhibitorios alteran este equilibrio, el cual puede resultar en descargas epilépticas. Hay dos mecanismos básicos de la excitabilidad entre neuronas: a) conducción axonal mediada por potenciales de acción y b) transducción de señales de célula a célula por transmisión sináptica. De esta manera los canales iónicos proveen las bases para estos procesos, por tanto alguna propiedad biofísica alterada por mutaciones en los genes que codifican para estos canales puede alterar directamente la excitabilidad e inducir ataques epilépticos (Lerche et al, 2001).

La epilepsia es heterogénea, incorporando numerosos síndromes epilépticos con diferentes etiologías (Tan et al; 2004). La contribución de factores genéticos y ambientales varían entre los diferentes desordenes (Gourfinkel-An et al; 2004; Gutiérrez-Delicado et al; 2004. Steinlein; 2003 ). Las epilepsias tienen en común la perturbación de la función cerebral como la expresión de síndromes individuales, estados de enfermedad, causas traumáticas o anomalías bioquímicas y nutricionales. Las etiologías básicas pueden ser categorizadas como idiopática (genética), criptogénica o sintomática cuando la anomalía localizada o generalizada puede ser reconocida. Mientras en algunas clasificaciones 'idiopáticas' es tratada sintomáticamente como 'criptogénica', la clasificación de epilepsia criptogénica implica la etiología sintomática cuya causa permanece oculta (Meinardi, 1999).

Los ataques epilépticos son caracterizados como parciales o generalizados. Los ataques parciales surgen en regiones específicas en la corteza las cuales tienen características identificables, subjetivas u observables. Estas pueden ir desde desórdenes de sensación hasta movimientos convulsivos de una parte del cuerpo que pueden llegar a ser generalizados. En los ataques parciales simples

no se pierde la conciencia. Durante los ataques parciales complejos hay pérdida de la conciencia y podrían presentarse con ataques parciales simples o comenzar como ataques parciales complejos con pérdida de la conciencia durante el ataque (Meinardi, 1999).

Los ataques generalizados tienden a extenderse a otras regiones del cerebro, son usualmente bilaterales en su manifestación inicial y están asociados con daño temprano de la conciencia (Meinardi, 1999). Este puede abarcar desde ataques de ausencia caracterizados solamente por daño de conciencia, hasta ataques tónico-clónicos generalizados (GTCS) con actividad convulsiva extensa.

En la década pasada, estudios de mapeo genético en familias en las cuales las epilepsias son de carácter hereditario de forma autosómica dominante han revelado la implicación de varios genes mutados, la mayoría de los cuales codifica para subunidades de canales iónicos. Por tanto, algunas formas de epilepsias idiopáticas son transferidas por herencia Mendeliana (Guerrini et al, 2003 y Scheffer et al, 2003).

Estas mutaciones en genes para canales de cloro reducen la habilidad de los receptores a GABA para inhibir a las neuronas (Kapur; 2003). Estos reportes establecieron por primera vez una asociación entre la inhibición mediada por receptores GABA<sub>A</sub> con epilepsias generalizadas idiopáticas en humanos.

Por mucho tiempo se propuso que la deficiencia en la inhibición GABAérgica es un factor clave en la patogénesis de la epilepsia. La inhibición de la expresión de la subunidad  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> en el hipocampo conduce a un síndrome de status epiléptico límbico, apoyando fuertemente la hipótesis de que el receptor GABA<sub>A</sub> juega un papel principal en la patogénesis de ataques y status epilépticos (Karle et al., 1998).

### **Epilepsia Generalizada Con Ataques Febriles.**

GEFS+ es el desorden arquetípico con una asociación familiar de ataques febriles y ataques epilépticos. Esta clasificación fue introducida por Scheffer y colegas para describir familias en las cuales coexisten ataques febriles que son atípicos (llamados "+") con epilepsia (Baulac et al, 2004). Esta epilepsia está relacionada con la edad infantil y se presenta con convulsiones acompañadas de fiebre como característica central. Los ataques ocurren temprano en el curso de enfermedades febriles, siendo ésta la primera indicación de tales enfermedades. Los ataques pueden ser de cualquier tipo pero son más frecuentemente tónico-clónicos generalizados, usualmente breves y limitados, seguidos por letargia postictal o sueño (Meinardi, 2000). Varios genes cuyas mutaciones causan esta enfermedad han sido implicados en GEFS+, entre estos SCN1B, SCN1A y GABRG2.

Los ataques febriles afectan aproximadamente al 3% de los niños menores de 6 años de edad. La mayoría de los casos de ataques febriles tienen una herencia compleja pero en casos raros se han encontrado formas autosómicas dominantes. Scheffer y Berkovic (1997) y Singh et al. (1999) describieron algunos pacientes que presentan una sub-serie de convulsiones febriles y que denominaron 'epilepsia generalizada con ataques febriles plus' (GEFS+ tipo 1). En ésta los pacientes expresan un fenotipo altamente variable, combinado con ataques febriles, ataques generalizados frecuentemente precipitados por fiebre a la edad de 6 años o más, y ataques parciales, con un grado variable de severidad. La mutación responsable de este síndrome interfiere con la habilidad de la subunidad para modular la cinética de la apertura del canal y fue mapeado en el cromosoma 19q13.1 y corresponde a la subunidad  $\beta 1$  de un canal de  $\text{Na}^{++}$  activado por voltaje (Wallace et al, 1998). Esta mutación cambia la estructura terciaria de la proteína por la disrupción de un puente disulfuro en el dominio extracelular (Gourfinkel-An et al; 2004).

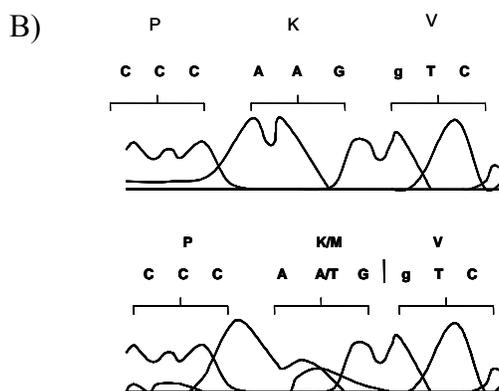
GEFS+ tipo 2 ha sido asociada con mutaciones en SCN1A que codifica para la subunidad alfa del canal de sodio activado por voltaje. Un cambio en el residuo R1648 de SCN1A reduce la tasa de inactivación de SCN1A, resultando en un incremento en el flujo de Na<sup>++</sup> y aumento en la excitabilidad en el SNC (Kaneko et al, 2002).

Recientemente se ha encontrado una segunda mutación en la subunidad  $\gamma$ 2 del receptor GABA<sub>A</sub> que causa GEFS+ tipo 3. Esta mutación ha sido estudiada en una familia en la que los miembros de tres generaciones sucesivas tienen un fenotipo consistente con GEFS+ (Baulac et al, 2001). Algunos miembros tenían ataques febriles y otros, ataques epilépticos afebriles, mientras otros presentaban ambos padecimientos. Una transversión A→T en el exón 8 resulta en la sustitución de una lisina por una metionina (Fig 3B). La mutación K289M afecta un residuo altamente conservado en el asa extracelular formada entre los segmentos transmembranales M2 y M3 (Fig.3A). Este residuo está conservado en las subunidades  $\alpha$ (1-6),  $\beta$ (1-3) y  $\gamma$ (1-3) del receptor GABA<sub>A</sub> humano y en subunidades ortólogas de otras especies (Fig. 3A).

A)

Humano	GABA <sub>R</sub> γ2	SFWINKD	AVPARTSLGITTTLT	MTTLSTIARKSLPKV	SYVTAMDLFVSVCFI	FVFSALVEYGLHYF	VSNRK
Ratón	GABA <sub>R</sub> γ2	SFWINKD	AVPARTSLGITTTLT	MTTLSTIARKSLPKV	SYVTAMDLFVSVCFI	FVFSALVEYGLHYF	VSNRK
Pollo	GABA <sub>R</sub> γ2	SFWINKD	AVPARTSLGITTTLT	MTTLSTIARKSLPKV	SYVTAMDLFVSVCFI	FVFSALVEYGLHYF	VSNRK
C. elegans	GABA <sub>R</sub> γ2	SFWLNRE	AVQARVAIGVTTTLT	MTLMTSTNASLPKV	SYVKSLDVFLGVCFF	IVFASLLEYAIGYF	MKRNR
Humano	GABA <sub>R</sub> γ2	SFWINKD	AVPARTSLGITTTLT	MTTLSTIARKSLPKV	SYVTAMDLFVSVCFI	FVFSALVEYGLHYF	VSNRK
Humano	GABA <sub>C</sub> ρ1	SFWIDRR	AVPARVSLGITTTLT	MTTIITGVNASMPRV	SYVKAVDIYLWVSEV	FVFLSVLEYAAVNYL	TTVQE

Figura 3. **Conservación evolutiva del residuo de lisina en GABRG2.** A) Conservación evolutiva del residuo K289. Los segmentos transmembrana M2 y M3 están subrayados. K289 está marcado. B) Secuencia del exon 8 mostrando la mutación K289M en un paciente heterocigoto. Arriba, secuencia normal; abajo, paciente enfermo (Tomado de Baulac 2001.)



En estudios funcionales desarrollados en ovocitos de *Xenopus laevis* se demostró que la mutación provoca un decremento en la amplitud de las corrientes generadas por GABA y una inactivación más rápida del mismo. Estas características conducirían a una duración más corta del potencial sináptico inhibitorio en las neuronas *in vivo* (Fig. 4) (Bianchi et al., 2002).

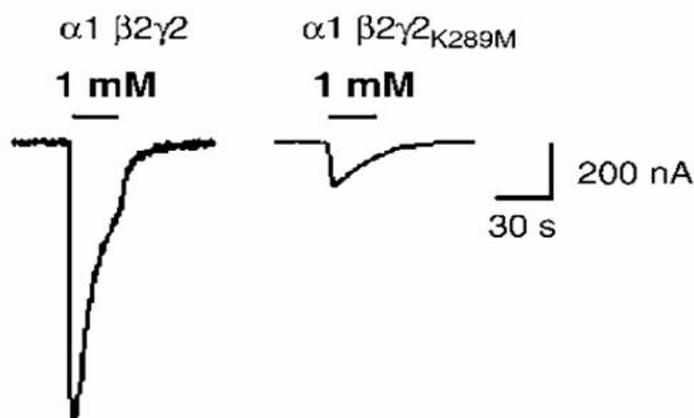


Figura 4. Efecto de la mutación  $\gamma 2_{K289M}$  sobre las corrientes generadas por GABA en ovocitos de *X. laevis*. La corriente generada por GABA ( $1\mu M$ ) es reducida por  $\gamma 2_{K289M}$ . Los trazos muestran registros representativos obtenidos de células inyectadas con receptores GABA de tipo silvestre (A) y mutados (B) (Tomado de Bianchi et al, 2002)

Se ha encontrado recientemente una mutación en el gen que codifica para la subunidad  $\delta$  de los receptores GABA<sub>A</sub>, y que contribuye a GEFS+. Cuando esta

mutante es expresada en células HEK los receptores formados presentan corriente reducidas (Dibbens et al; 2004).

## JUSTIFICACIÓN

Los receptores GABA ionotrópicos están constituidos por una familia de diversas subunidades homólogas. Esta heterogeneidad molecular corresponde a diferencias funcionales entre isoformas del receptor las cuales pueden contribuir a la diversidad de sinapsis inhibitorias en el SNC. En sistemas de expresión heteróloga, las subunidades  $\rho$  pueden también ensamblar con miembros de la familia de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> pero no es claro si tales combinaciones ocurren *in vivo*. Mas recientemente se ha enfatizado la duda sobre la existencia de un nuevo grupo de receptores con características farmacológicas que son una mezcla entre aquellas presentadas por los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>; particularmente en células piramidales CA1 de rata. Estos canales son sensibles a bicuculina, de acuerdo con las propiedades mostradas por el receptor GABA<sub>A</sub> y activados selectivamente por el ácido cis-4-aminocrotónico (CACA) y bloqueados por el ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il) metilfosfínico (TPMPA), tal como un típico receptor GABA<sub>C</sub>. De igual manera es importante recalcar la presencia de una mezcla de receptores en interneuronas hipocampales con diferencias farmacológicas y que se especula podría tratarse de una asociación entre subunidades  $\rho$  y receptores GABA<sub>A</sub>.

Además existe la evidencia de que subunidades  $\rho 1$  están expresadas en neuronas de tallo cerebral de rata, donde podrían estar ensambladas con subunidades GABA<sub>A</sub>. Estos receptores presentan respuestas a CACA que es significativamente incrementada por pentobarbital y bloqueada por TPMPA. Por otra parte, la subunidad  $\rho 1$  fue detectada en neuronas del núcleo vagal dorsal donde fueron también localizadas las subunidades  $\alpha 1$  y  $\gamma 2$ . El potencial de la formación de heterómeros de las subunidades GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> pueden por tanto proveer un importante blanco para futuras investigaciones terapéuticas.

Las epilepsias generalizadas idiopáticas representan de un 20 a un 30% de todas las epilepsias y tienen un componente genético significativo. Se han encontrado mutaciones en genes de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en epilepsias

humanas. GEFS+ y epilepsias de ausencia clásica con ataques febriles están asociadas con mutaciones en el gen que codifica para la subunidad  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> (GABRG2).

Los receptores GABA son los principales responsables de la inhibición sináptica en el cerebro. Un estudio de sus propiedades funcionales y en particular de la subunidad  $\gamma 2$  mutada en los sitios asociados a epilepsias hereditarias contribuirá a entender mejor las bases moleculares de esta enfermedad.

### **HIPÓTESIS**

Las mutaciones en la subunidad  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> alteran las propiedades funcionales de un receptor heteromérico formado por subunidades GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>.

## **OBJETIVOS**

### *Objetivo general*

Estudiar las propiedades funcionales de los receptores quiméricos GABA<sub>A</sub>/GABA<sub>C</sub> incluyendo la mutación K289M de la subunidad  $\gamma 2$ .

### *Objetivos específicos*

- Determinar las regiones del SNC donde se co-expresan los RNAs que codifican para las subunidades  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> y  $\rho 1$  del receptor GABA<sub>C</sub> mediante retrotranscripción–reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).
- Construir la mutación asociada a GEFS+ en la subunidad  $\gamma 2$  mediante mutagénesis sitio dirigida.
- Expresión de las subunidades  $\rho 1$  y  $\gamma 2$  mutada en células HEK-293 y estudiar sus propiedades electrofisiológicas.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **Distribución De Receptores GABA<sub>c</sub> En El SNC**

Para tal objetivo se tomaron muestras de tejido de regiones del SNC humano, a partir de las cuales se realizó la extracción de RNA total para posteriormente llevar a cabo la RT-PCR con oligonucleótidos específicos para cada subunidad.

#### **Disección y Toma de Muestras**

Se obtuvieron hipocampo, cerebelo, corteza cerebral (temporal y frontal), tálamo y cuerpo estriado de cerebros humanos tomados del banco de cerebros de la Universidad de California en Irvine. Estas áreas cerebrales son las más afectadas en pacientes epilépticos GEFS+. El tejido fue colocado en hielo y transportado al laboratorio en un lapso menor a 90 minutos.

Posterior a su disección el tejido fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **Extracción de RNA Total**

El análisis del RNA mensajero (RNAm) nos permite determinar el grado de expresión de un gen de interés. Es por ello que una de las metodologías ampliamente utilizadas en el estudio de la localización de la expresión de un gen específico es la caracterización de su RNAm correspondiente. Para realizar la extracción de RNA se requieren las siguientes condiciones: lisis total de las células, desnaturalización de los complejos formados por los ácidos nucleicos y las proteínas, inactivación de las RNAsas endógenas y eliminación de cualquier ácido desoxirribonucleico (DNA) contaminante.

Se utilizó el método de extracción de RNA de tiocianato de guanidina– fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi 1987; Sambrook y Russell 2001). Las muestras de tejido del SNC fueron pesadas y colocadas en tubos de 50 ml. Se agregó 1 ml de solución D (tiocianato de guanidina, agua DEPC 0.1%, citrato de Na 0.75M y sarcosil 10%) por cada 100 mg de tejido. Inmediatamente después se hizo un homogenizado de la mezcla con un homogenizador Ultraturrax T25. En seguida se agregó 0.1 ml de acetato de sodio 2M pH 4, 1 ml de fenol (saturado con agua DEPC) y 0.2 ml de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), mezclando después de agregar cada una de las sustancias. La suspensión final fue agitada vigorosamente por 10 s y enfriada en hielo por 15 min. Las muestras fueron centrifugadas (Avanti™ 30 Beckman) a 10000 g por 20 min a 4°C. Después de la centrifugación la fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y mezclada con 1 ml de isopropanol y colocada a –20°C por 1 h. Nuevamente fue centrifugada a 10000 g por 20 min. El botón de RNA resultante fue disuelto en 0.3 ml de solución D y precipitado con un volumen de isopropanol a –20°C por 1 h. Después de volver a centrifugar la muestra a 10000 g por 10 minutos a 4°C, el botón resultante fue resuspendido en etanol al 75%, sedimentado una vez más por medio de centrifugación y secado al vacío. El RNA total resultante fue resuspendido en agua tratada con DEPC (0.1%), 50 µl por cada 100 mg de tejido.

La calidad del RNA total fue comprobada mediante su análisis por electroforesis en geles de agarosa y se determinó el rendimiento y la concentración espectrofotométricamente.

### **RT-PCR**

#### Transcripción inversa

El estudio sobre la expresión de un gen en particular puede apoyarse en el análisis de su RNAm correspondiente. Para ello, uno de los métodos más utilizados es la retrotranscripción, en donde una vez que se obtiene el RNA, éste es empleado como molde por la enzima transcriptasa reversa para sintetizar el DNA complementario o DNAc.

### Amplificación por PCR

Una de las metodologías más utilizadas para amplificar un fragmento de DNA específico, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En esta reacción se puede amplificar específicamente una región del DNA, hasta llegar a tener un gran número de copias en poco tiempo, aún cuando el DNA original esté presente en cantidades pequeñas. Esta reacción es catalizada por una DNA polimerasa que sintetiza una hebra de DNA en dirección 5' a 3', usando como molde una de las hebras de DNA. Con esta reacción sólo se amplifica el fragmento de interés, ya que los iniciadores específicos se complementan con las regiones de DNA que limitan dicho fragmento.

Se utilizó éste método para determinar las regiones cerebrales antes mencionadas en donde se encuentra el RNA que codifica para las subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>. Utilizamos  $\alpha$ - tubulina como nuestro control. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Techgene de TECHNE usando SuperScript One-Step RT-PCR con Taq Platinum (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del productor.

Se utilizó RNA total para la reacción de RT-PCR y se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada subunidad (tabla 1) y  $\alpha$ -tubulina como control. La síntesis de cDNA fue llevada a cabo con 1 $\mu$ g de RNA total en 25  $\mu$ L de buffer de síntesis del cDNA conteniendo 0.4 mM de cada dNTP, 2.4 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ l de RNAsin 1U/ $\mu$ l (Inhibidor de RNAasa, Promega), y 0.5  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa RT/Platinum Taq Mix.

Tabla 1. Secuencias de Oligonucleótidos para RT-PCR

Subunidad	Secuencia	Producto amplificado (pb)
$\gamma$ 2	5' CCTgATATAggAgTgAAgCCAACgTTAATT3' 5'gTgACATAggAgACCATggggAgCgATTTCC 3'	779
$\rho$ 1	5'-ATgAgATTTggCATCTTTCTTTgT-3' 5' ggCAgggCCTCCgAAgCCAagg3'	316

$\alpha$ -tubulina	5'-CCAgATgCCAAGTgACAAgACC-3' 5'gCCTCATTgTCTACCATgAAggC3'	522
--------------------	---	-----

La síntesis del DNAc y la amplificación por PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: un ciclo de síntesis de DNAc a una temperatura de 50°C por 30 minutos y una pre-desnaturalización a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 s, apareamiento a 51°C por 30 s y extensión a 72°C por 1 m ; por último un ciclo de extensión final a 72°C por 5 minutos.

## ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

De las diferentes técnicas empleadas para separar fragmentos de ácidos nucleicos, la electroforesis en gel de agarosa es una de las más utilizadas. Esta técnica permite separar ácidos nucleicos de acuerdo a su tamaño. En ella, las muestras se someten a la acción de un campo eléctrico de intensidad y dirección constantes. Los ácidos nucleicos poseen carga negativa en un pH neutro, por lo que migran hacia el ánodo con una velocidad que depende del peso molecular de la muestra, la concentración de agarosa, la conformación del DNA, el voltaje aplicado, la presencia de agentes intercalantes y la composición del amortiguador de electroforesis.

### Protocolo

Para el análisis electroforético del RNA se utilizaron geles de agarosa 1% en TAE 1X. La muestra de RNA (1µg) se mezcló con amortiguador de carga (glicerol 50%, azul de bromofenol 0.4%). Como buffer de corrida se utilizó TAE 1X.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 0.4% en TAE 1X.

## INMUNOHISTOQUÍMICA

Los estudios de inmunohistoquímica permiten identificar, caracterizar y cuantificar *in situ* moléculas de interés. Gracias a que las interacciones antígeno anticuerpo son muy específicas se puede identificar la expresión de alguna proteína (antígeno) en un tejido determinado. Para que un anticuerpo pueda ser

detectado en el tejido, éste tiene que estar acoplado a enzimas, a moléculas fluorescentes o a compuestos electrodenso.

#### Preparación de los tejidos

Se recolectaron las muestras de cerebelo humano. Después de la disección las muestras se colocaron en solución fijadora (paraformaldehído 3.5 %, sacarosa 30 %). Los tejidos se colocaron en medio para congelación de tejidos (Tissue Tek®) 1:1 por 30 min. Los cortes se realizaron a 11 µm en crióstato (LEICA CM 1850) y los tejidos fueron adheridos a portaobjetos (DAIGGER).

#### Unión de Anticuerpos.

##### a) Primer día de inmunodetección

- Tres lavados (10 min c/u) en PBT (solución salina de fosfatos + tritón 1%)
- Incubación 15 minutos con leche descremada
- Lavado rápido en PBT
- Incubación con los anticuerpos primarios para las subunidades  $\rho 1$  (1:250) (humano (cabra), Santa Cruz Biothechnology) y  $\gamma 2$  (1:500) (humano (conejo), CALBIOCHEM) del receptor GABA humano, durante 18 hr
- Se colocaron las laminillas a 4 °C para evitar que los anticuerpos se adhirieran al vidrio

##### b) Segundo día de inmunodetección

- Tres lavados de 15 minutos cada uno en PBT
- Se incubaron con el anticuerpo secundario (chivo anti conejo y burro anti cabra) marcado con peroxidasa de rábano (1:250) durante 1 hr y 30 min. Se lavaron 3 veces por 15 min en PBT.
- Se agregó 1 ml de la solución compuesta de 75µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DAB 25 mg/100 ml buffer fosfatos. Se incubó durante 20 min. Se detuvo la reacción con lavados en agua.
- Se colocó glicerol en las laminillas para su posterior observación en microscopio (ZEISS, AXIOSKOPE PLUS).

### Mutagénesis Sitio Dirigida Por La Reacción En Cadena De La Polimerasa.

La mutagénesis *in vitro* es utilizada para cambiar la secuencia base de un segmento de DNA. Los cambios pueden ser localizados o generales, aleatorios o puntuales. La mutagénesis sitio dirigida fue usada para introducir la mutación, en el residuo 289 (K→M) de la subunidad  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub>.

El primer paso fue diseñar oligonucleótidos mutagénicos. Fueron necesarios cuatro “primers” para introducir una mutación sitio específica por traslape durante la extensión (Tabla 2). Un par de primers fueron usados para amplificar el DNA que contiene el sitio de la mutación unida con secuencias corriente arriba (Start5). El “primer” que está hacia adelante contiene la mutación que fue introducida al DNA templado, mientras que el “primer” reverso contiene una secuencia silvestre (KM).

El segundo par de “primers” fueron usados para amplificar el DNA que contiene una secuencia silvestre corriente abajo. El “primer” reverso de este par contiene un sitio de fosforilación (KMpost) que nos permitió ligarlo al fragmento que contiene la mutación. El segundo primer que va hacia delante tiene una secuencia tipo silvestre (End10) y tendrá un sitio de restricción en su región 5' (Sal1). El templado de DNA utilizado para las amplificaciones fue DNA plasmídico de la subunidad  $\gamma 2$  de GABA<sub>A</sub>.

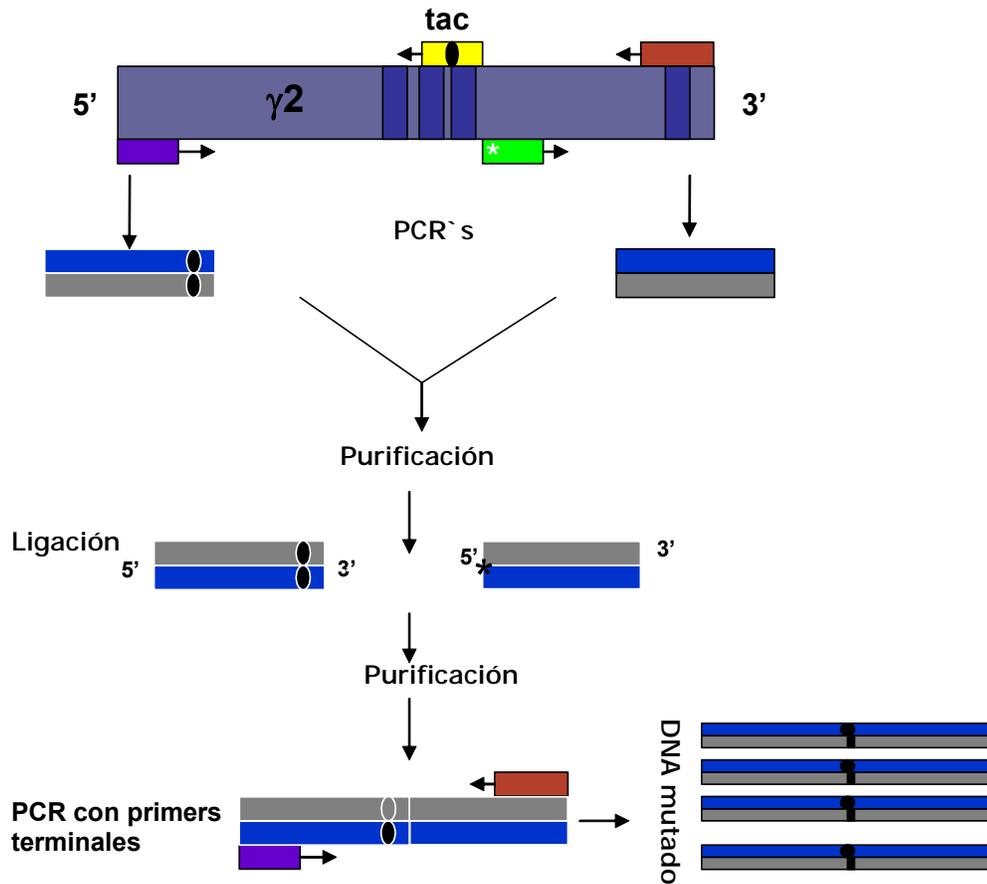


Figura 5 Estrategia de la mutación sitio dirigida para la subunidad  $\gamma 2$ . \* Denota el sitio ocupado por la mutación

Tabla 2. Secuencias de Oligonucleótidos para RT-PCR

Primers	Secuencia	Producto amplificado (pb)
Start5 KM	5' ggATCCTgATggTATCTgCAAgCgTTTTgC 3' 5'gTgACATAggAgACCATggggAgCgATTTCC3'	1019
KMpost End10	5'P-gTCTCCTATgTCACAgCgATggATCTCTTT 3' 5'CAgATACTTATCAACCACATAgAggATTAT3'	525

Las dos series de “primers” fueron usados en dos reacciones de amplificación separadas, para generar los fragmentos a unirse.

Tabla 3. Mezcla De Reacción

<b>Componentes</b>	<b>Volumen/50µl</b>
Buffer 10 x	5µl
dNTPs 10 Mm	1µl
Primer sentido 2.5 Mm	4µl
Primer antisentido 2.5 µM	4µl
DNA 10 ng/µl	5µl
Pfu 5 U/µl	0.5µl
H <sub>2</sub> O miliQ	cbp 50µl

Tabla 4. Condiciones De PCR

	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>No. de ciclos</b>
Desnaturalización	94° C	15 s	30
Alineamiento	50° C	15 s	
Extensión	72° C	1 min 30 s	
Extensión	72° C	5 min	1

Los productos resultantes de la amplificación fueron analizados en un gel de agarosa al 0.8%, utilizando además un marcador de peso molecular para corroborar su tamaño y posteriormente purificados mediante el protocolo del estuche de extracción QIAquick GEL (QIAGEN).

Una vez identificados los productos de PCR en un gel de agarosa se procedió a cortar las bandas de Interés, visualizando con luz UV (usando un bisturí nuevo). Se colocaron las bandas en tubos Eppendorf para determinar el peso de las bandas. Se agregaron 3 volúmenes de Buffer QG (buffer de solubilización) incubando durante 10 min a 50° C hasta disolver la agarosa (agitando al vortex) y se agregó un volumen de isopropanol a cada muestra. Esta solución se transfirió a una columna del estuche. Centrifugando 1 min a 10000 rpm. Se descartó el precipitado. Se agregó 0.5 ml de Buffer QG para después centrifugar 1 min a 10000 rpm. Se añadieron 0.75 ml de Buffer PE (buffer de lavado 5x) se centrifugó

2 min a 10000 rpm. Después se colocó la columna en un tubo limpio, añadiendo 30 µl de agua y centrifugando 1 min a 10000 rpm.

Los fragmentos obtenidos de la purificación fueron mezclados para ser ligados y obtener el gen con la mutación K289M de la subunidad  $\gamma_2$  de GABA<sub>A</sub>.

Tabla 5. Condiciones para la Reacción de Ligación

<b>Componente</b>	<b>Volumen/20µl</b>
Buffer 5X	4µl
DNA del fragmento mutado 5'	6µl
DNA del fragmento 3'	4µl
T4 DNA ligasa 1U/µl	2µl
H <sub>2</sub> O miliQ	cbp 20 µl

Se incubó a temperatura ambiente por 16 hr. Posteriormente el producto de la ligación fue analizado en un gel de agarosa al 0.8%, para realizar una nueva purificación del DNA quimérico formado por los dos fragmentos pero ahora de acuerdo al protocolo del Kit de extracción QIAquick GEL (QUIAGEN).

El fragmento purificado fue tomado como templado para una nueva reacción de PCR tomando como "primers" nuevamente aquellos que nos permitieron insertar un sitio de restricción.

Tabla 6. Mezcla De Reacción

Componentes	Volumen/50µl
Buffer 10 x	5µl
dNTPs 10 mM	1µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3.5µl
Primer sentido 2.5µM	4µl
Primer antisentido 2.5 µM	4µl
DNA 10 ng/µl	15µl
Taq polimerasa 50/µl	0.5µl
H <sub>2</sub> O miliQ	cbp 50µl

Tabla 7. Condiciones De PCR

	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Hot Start	94° C	2 min	1
Desnaturalización	94° C	15 s	30
Alineamiento	55° C	15 s	
Extensión	72° C	1 min 30s	
Extensión	72° C	5 min	1

Los productos de PCR positivos fueron clonados y secuenciados.

### CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

La clonación de DNA es una técnica fundamental para producir grandes cantidades de un fragmento de DNA específico. El fragmento que debe clonarse primero se une a un vector, que es un vehículo para transportar DNA exógeno y después se introduce a una célula huésped adecuada. Los plásmidos bacterianos son uno de los vectores más utilizados. Estos son moléculas de DNA de doble cadena, circulares, con un tamaño que va de 1 Kb hasta más de 200 Kb. Se encuentran en diferentes especies bacterianas, y se caracterizan por tener una replicación independiente al cromosoma bacteriano, y por conferirle a la bacteria propiedades especiales, como la resistencia a los antibióticos. El plásmido puede ser introducido a la bacteria por un proceso llamado transformación, en donde una

vez que las bacterias son tratadas con cationes divalentes ( $\text{Ca}^{++}$ ) para permeabilizar su membrana, se le pone en contacto con el DNA plasmídico para su incorporación al citoplasma de la bacteria.

### CLONACIÓN DEL DNAc $\gamma_{2K289M}$ EN EL VECTOR pCR4-TOPO

Se usó el estuche de clonación: TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen).

El protocolo utilizado fue el de la casa comercial y se describe a continuación:

Se ligó el producto de PCR purificado y el vector pCR4-TOPO como se indica en la tabla 8.

Tabla 8. Reacción de ligación usada en la construcción del vector  $\gamma_{2K289M}$ -pCRTOPO

Reactivos	Volumen/5 $\mu$ l
Solución salina	1 $\mu$ l
TOPO vector 100 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
$\gamma_{2K289M}$ 300 ng/ $\mu$ l	3 $\mu$ l

La reacción se mezcló e incubó durante 4 h a temperatura ambiente y se colocó la

reacción en hielo para proceder a la transformación de bacterias competentes.

### **Transformación por choque térmico**

Se adicionó 2  $\mu$ l de la mezcla anterior (DNA-vector) a un vial de *E coli* competentes para transformación (One Shot) y se mezcló; se incubó 30 minutos en hielo, después se dió el choque térmico a 42°C por 30s y se transfirió inmediatamente el tubo al hielo. Se añadieron 250  $\mu$ l de medio S.O.C. (triptona 2%, extracto de levaduras 0.5 %, NaCl 10mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM), se incubó a 37°C durante 2 h a 200 rpm, después se sembraron 100  $\mu$ l de las células en una caja de Petri que contenía medio LB con *Ampicilina* (50  $\mu$ g/ml). Se dejó incubando toda la noche a 37°C y las colonias se levantaron individualmente para ser inoculadas en tubos conteniendo medio LB

más *Ampicilina*; se volvió a incubar toda la noche a 37°C en agitación (200 rpm) y se procedió a hacer la extracción de DNA plasmídico.

### **Minipreparación: extracción DNA plasmídico por lisis alcalina**

Las clonas recombinantes obtenidas fueron procesadas para la obtención del DNA plasmídico utilizando la técnica de lisis alcalina a partir del cultivo (Sambrook et al, 2001).

Se propagaron las colonias en 4 ml de medio LB (Bactotripton 10 g/L, extracto de levaduras 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 6.5-7.0) con 50 µg/ml de ampicilina, incubando a 37°C con agitación vigorosa toda la noche. Después se centrifugaron 1.5 ml de medio durante 2 min a 14,000 rpm; el sobrenadante se descartó completamente, y la pastilla se resuspendió en 100 µl de solución I (Tris-Cl 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, pH 8.0). Se agitó vigorosamente en el vortex hasta que la pastilla se disolviera completamente, y se incubó 5 min en hielo. Posteriormente se adicionaron 200 µl de solución II (0.2 ml de NaOH 10 N, 8.8 ml de agua y 1.0 ml de SDS 10% ), se mezcló por inversión, se incubó 5 min en hielo, después se agregaron 150 µl de solución III (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético concentrado, 28.5 ml de agua), se agitó en un vortex y se incubó 5 min en hielo. El tubo se centrifugó 5 min a 14,000 rpm, el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, se agregó un volumen de fenol saturado y un volumen de SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico, 49:1), se mezcló al vortex 5 min, se centrifugó 15 min a 14,000 rpm; el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó 1 h a -70°C, se repitió el paso de centrifugación y se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con etanol al 70% frío y después de centrifugar, se removió completamente el sobrenadante dejando secar la pastilla; finalmente ésta fue resuspendida en 50 µl de H<sub>2</sub>O.

## CARACTERIZACIÓN DE LAS CLONAS RECOMBINANTES OBTENIDAS

El vector recombinante (vector pCARTOPO) tiene dos sitios de corte *EcoRI* los cuales flanquean el inserto, por lo que las clonas fueron caracterizadas después de digerir el vector recombinante con esta enzima, observando el patrón de migración de los insertos liberados en un gel de agarosa al 0.8%.

Tabla 9. Reacción de digestión  $\gamma_{2K289M}$ -pCARTOPO con *EcoRI*

Reactivos	Volumen/ 10 $\mu$ l
Buffer Neb 3 10 X	1 $\mu$ l
<i>EcoRI</i> 10 U/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
DNA (clonas) 200 ng/ $\mu$ l	4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Cbp 10 $\mu$ l

Otra alternativa que utilizamos para la caracterización de las clonas fue mediante PCR utilizando primers internos a la secuencia generada por el DNAC de  $\gamma_2$

Tabla 10. Secuencia de primers para caracterización

Primers	Secuencia	Producto amplificado (pb)
RQpost	5'P- CCTgATATAggAgTgAAgCCAACgTTAATT3'	779
KM	5'gTgACATAggAgACCATggggAgCgATTTCC3'	

### Condiciones de PCR

Tabla 11. Mezcla De Reacción

<b>Componentes</b>	<b>Volumen/50µl</b>
Buffer 10 x	5µl
dNTPs 10 µM	1µl
Primer sentido 2.5 µM	4µl
Primer antisentido 2.5 µM	4µl
DNA 10 ng/µl	2µl
Taq polimerasa	0.5µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3.5µl
H <sub>2</sub> O miliQ	cbp 50µl

Tabla 12. Condiciones De PCR

	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>No. de ciclos</b>
Desnaturalización	94° C	15 s	30
Alineamiento	50° C	15 s	
Extensión	72° C	50s	
Extensión	72° C	5 min	1

#### **Conservación de las clonas de interés**

Las clonas de interés fueron almacenadas a -80°C, con 30% de glicerol (Sambrook y cols, 2001).

### SUBCLONACIÓN MOLECULAR DE LA SUBUNIDAD $\gamma$ 2K289M

#### Secuenciación

Se realizó por medio de secuenciación automatizada con un aparato ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Unidad de Biología Molecular INB-UNAM).

La técnica utilizada para la secuenciación es una adaptación de la descrita por Sanger y cols en 1977. La secuenciación enzimática se realizó siguiendo las especificaciones del estuche Big Dye sequencing V.2, el cual utiliza los

terminadores ddNTP's marcados con un fluorocromo: IRDye-800. Los productos se analizaron en el Secuenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Para determinar la secuencia nucleotídica del gen mutante se utilizaron en primer instancia solo los iniciadores que se aparean en el vector (M13 Forward y M13 Reversa), y posteriormente debido a que estos iniciadores solo permitían obtener las secuencias de los extremos 5' y 3'. Se utilizaron diferentes "primers" que se encontraran cerca de la mutación y permitiera su lectura (Tabla 13).

Tabla 13. Secuencia de primers para secuenciación

Primers	Secuencia
Ext5	5'CTgCAACCAAgAggCAAgAggCgAg3'
Ext3	5'TTATTTAAgTggACTTAgAACAgA3'
MidKM	5'TgTTCCAgCCAgAACATCTTTAgg3'

#### **Análisis de las secuencias.**

Las secuencias parciales obtenidas a partir del gen mutante fueron analizadas mediante el programa BLAST. El alineamiento de las secuencias y la integridad génica se llevo acabo usando los programas computacionales DNAMAN y CLUSTAL W, además fueron analizados manualmente, para asegurar el mejor alineamiento.

#### **Subclonación del gen $\gamma 2_{K289M}$ en pcDNA3**

Con la finalidad de usar un vector que permitiera la expresión del gen  $\gamma 2_{K289M}$  en células eucariotas se subclonó el gen de interés en el vector pcDNA3 (Invitrogen) mediante una subclonación dirigida. Se llevó a cabo una digestión con las enzimas *EcoRI* y *EcoRV* para obtener el extremo 5' del cDNA de  $\gamma 2_{K289M}$  a partir de pCRTOPO- $\gamma 2_{K289M}$ , un segundo corte con *EcoRI* y *NotI* para obtener el vector pcDNA3 y finalmente el extremo 3' de  $\gamma 2$  silvestre se obtuvo de la digestión con *EcoRV* y *NotI* del plásmido pGEM-T- $\gamma 2_{R43Q}$ .

## CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES RECOMBINANTES

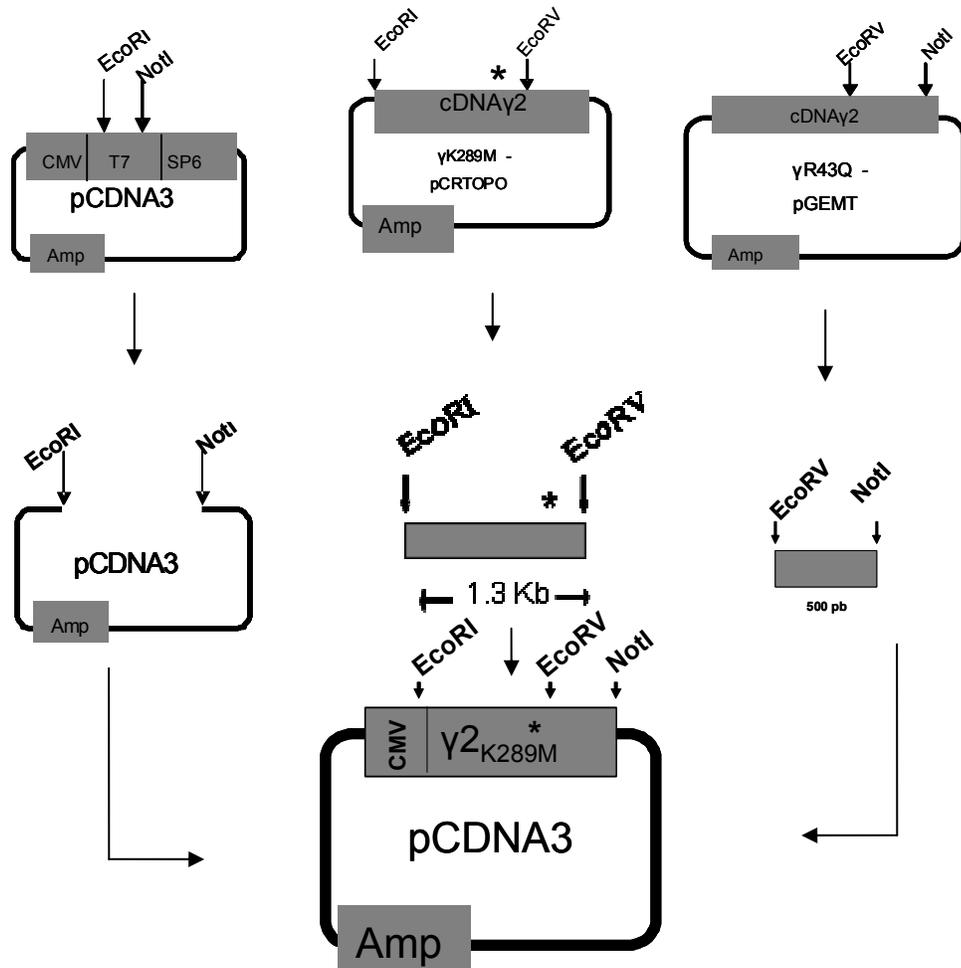


Figura 6. Estrategia de subclonación para la construcción del plásmido pCDNA3- $\gamma 2_{K289M}$ . \* denota el sitio ocupado por la mutación.

Las reacciones de digestión usadas se muestran en las siguientes tablas

Tabla 14 . Reacción de digestión para el vector pCDNA3

Reactivos	Volumen/ 50 $\mu$ l
Buffer NEB 3 10 X	5 $\mu$ l
+ <i>EcoRI</i> 10 U/ $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
DNA	40 $\mu$ l
NotI 15 U/ $\mu$ l	2.5 $\mu$ l

Tabla 15. Reacción de digestión para la clona  $\gamma 2_{K289M}$ - pCRTOPO

Reactivos	Volumen/ 20 $\mu$ l
Buffer NEB 3 10 X	5 $\mu$ l
EcoRI 10 U/ $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
DNA	40 $\mu$ l
EcoRV 10 U/ $\mu$ l	2.5 $\mu$ l

Tabla 16. Reacción de digestión para la clona  $\gamma 2_{R43Q}$ - pGEMT

Reactivos	Volumen/ 20 $\mu$ l
Buffer NEB 3 10 X	5 $\mu$ l
EcoRV 10 U/ $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
DNA	40 $\mu$ l
NotI 15 U/ $\mu$ l	2.5 $\mu$ l

Las reacciones de digestión se incubaron por 90 min a 37°C.

El producto de la digestión se resolvió en un gel de agarosa al 0.8 % y las bandas de interés fueron purificadas como se indicó en la sección anterior

La ligación del vector y el inserto se llevó acabo usando la siguiente reacción.

Tabla 17. Reacción de ligación  $\gamma 2_{K289M}$ -pCDNA3

Reactivos	Volumen/40 $\mu$ l
Buffer de ligación 2 X	10 $\mu$ l
pCDNA3	5 $\mu$ l
$\gamma 2_{K289M}$ - pCRTOPO	15 $\mu$ l
$\gamma 2_{R43Q}$ - Pgemt	15 $\mu$ l
T4 DNA Ligasa 5U/ $\mu$ l	3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O miliQ	cbp 50 $\mu$ l

Se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

El producto de la ligación se transformó en células DH5 $\alpha$  mediante el protocolo anteriormente descrito, se extrajo el DNA plasmídico y las clonas se identificaron mediante la digestión con las enzimas EcoRI- NotI para liberar un pequeño fragmento del inserto esperado  $\gamma 2_{K289M}$

Tabla18. Reacción de digestión para caracterización del gen  $\gamma 2_{K289M}$ -pCDNA3

Reactivos	Volumen/10 $\mu$ l
Buffer Neb 3	1 $\mu$ l
$\gamma 2_{K289M}$ -pCDNA3	2 $\mu$ l
Eco 10 U/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
EcoRV 10 U/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O miliQ	Cbp 10 $\mu$ l

## CULTIVO CELULAR

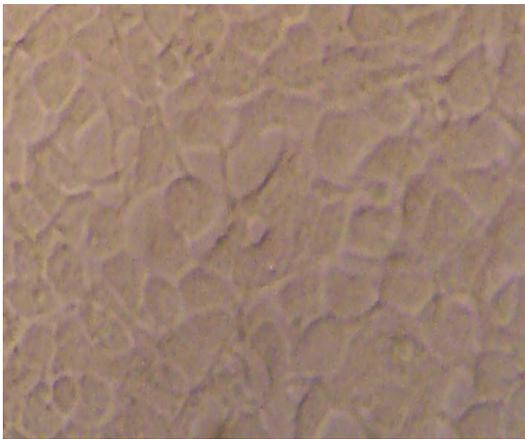


Figura 7. Fotografía de cultivo de células HEK293.

La línea celular HEK293 fue obtenida del riñón humano embrional primario transformado por adenovirus humano tipo5 (Ad 5). Las células son hipotriploides y forman tumores en ratones desnudos. Las células HEK293 expresan un receptor de superficie celular inusual heterodimérico para vitronectina. Compuesto de la subunidad beta 1 de la integrina y la subunidad  $\alpha$  v del receptor de vitronectina. Este receptor parece mediar la adherencia de la célula

exclusivamente a vitronectina. Las células HEK293 expresan receptores para la hormona de crecimiento e IL6. También expresan un ligando aún no identificado para TNFRSF19 miembro de superfamilia del receptor para TNF).

Las células HEK293 no estimuladas también secretan IGF-BP-2 y la expresión de esta proteína es sobrerregulada después de la incubación con IGF-1, IGF-2 o la insulina. Las células HEK293 también secretan gastrina- glicina que parece funcionar como un factor de crecimiento autocrino para estas células .

Con frecuencia las células HEK293 son usadas como un reemplazo para células primarias humanas embrionarias de riñón. HEK293 son muy sensibles a la infección a adenovirus y han sido utilizadas extensamente para el aislamiento rutinario de adenovirus humano y otros virus. Estas células han sido usadas para estudiar una amplia variedad de preguntas biológicas de célula, incluyendo el estudio de interacciones de anfitrión de virus, la expresión heteróloga de proteínas recombinantes, desarrollo de vectores para la terapia génica. Después de la transfección de las células por la expresión conveniente de vectores en estas células han sido empleados también para los estudios de la fisiología y/o la regulación de canales iónicos, moléculas de adherencia, citocinas y receptores.

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hablaremos de diferentes tipos de cultivos : de órganos, explantes, primarios o secundarios.

#### Subcultivo de Células HEK

Para preparar el medio se agregó higromicina B (Sigma) a 100 ml de alícuotas de medio de crecimiento (este debe prepararse fresco). Se colocó en la incubadora para temperar. Posteriormente se agregó la tripsina (GIBCO) 1:10 y colocó en la incubadora.

#### Pasajes

Primero se removió el medio y se lavó con 10 ml de PBS. Removimos el PBS. Se agregó 1 ml de tripsina, y golpeó por un minuto. Se agregó 10 ml de medio de crecimiento. Se transfirieron las células en suspensión a un tubo y se centrifugó por 5 minutos a 800 rpm. Se removió el sobrenadante y resuspendió en 10 ml de medio de crecimiento. Se tomó 1.5 ml de las células en suspensión, se transfirieron a un frasco de crecimiento, y entonces se agregó 20 ml de

crecimiento de medio. Se tomó 0.1 ml y se agregó a un segundo frasco como reserva.

## **TRANSFECCIÓN DE CELULAS**

La manipulación de las células en cultivo requiere en muchos casos la introducción de moléculas en el interior de las mismas, bien sea para observar el efecto que produce la molécula en sí (por ejemplo una droga inhibidora de las proteasas citosólicas) o para producir la síntesis de otras moléculas (por ejemplo la introducción de un plásmido en el que se ha colocado bajo el control de un promotor que funciona en la célula de elección una secuencia codificante para la proteína buscada). En este último caso la célula es empleada como factoría de síntesis de moléculas a la que se le suplementa con la información que precisa.

Las células de riñón humano embrionarias (HEK-293) fueron cultivadas en placas de 35 mm con una confluencia de 80%, transfectadas con  $\rho 1$ ,  $\rho 1\gamma 2L$  (1:1) o  $\rho 1\gamma 2K289M$  (1:1) utilizando el reactivo de transfección GeneJuice (Novagen).

### Procedimiento

El día antes de la transfección, se plaquearon  $1-3 \times 10^5$  células en un medio de crecimiento completo en discos de 35 mm. Se incubaron a 37° C (5% CO<sub>2</sub>) durante toda la noche. Las células deben ser 50-80% confluentes antes de la transfección.

Para cada disco de 35 mm, se colocaron 100  $\mu$ l de medio libre de suero en un tubo estéril. Se agregaron 3  $\mu$ l de Gene juice goteando directamente al medio y se mezcló perfectamente por vortex. Los volúmenes pueden ser aumentados proporcionalmente para la transfección de múltiples discos con el mismo DNA. Se mezcló perfectamente en el vortex. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Por cada disco de 35 mm que se transfectó, se agregó 1  $\mu$ g de DNA a la mezcla

Genejuice/ medio libre de suero. Se mezcló pipeteando cuidadosamente. Se incubó la mezcla DNA/ Genejuice a temperatura ambiente por 5-15 min.

Se agregó todo el volumen de la mezcla DNA/ Genejuice por goteo a las células en medio de crecimiento completo. Se distribuyeron las gotas sobre la superficie del disco, y se movieron cuidadosamente el disco para asegurarse de la distribución. Se incubó las células durante 24-72 h a 37°C (5%CO<sub>2</sub>).

## **REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS**

### **“WHOLE CELL PATCH CLAMP”**

La técnica de registro “Patch Clamp” es utilizada para estudiar el comportamiento de canales iónicos simples o corrientes macroscópicas en células pequeñas. La técnica de “whole cell” permite controlar la composición en ambos lados de la membrana. Esta es una herramienta útil para determinar las propiedades biofísicas de las corrientes en estudio. Una pipeta hecha de vidrio con un diámetro en la punta de solo unos pocos micrometros es presionado sobre la membrana celular para formar un gigasello. Cuando la succión es aplicada a la pipeta la membrana se rompe y el citoplasma y la solución de la pipeta comienzan a mezclarse. Después de un corto tiempo esta mezcla es completa y el ambiente iónico en la célula es similar a la solución salina usada en la pipeta.

Las células fueron perfundidas con una solución extracelular conteniendo (en mM): NaCl, 140; KCl, 5; MgCl<sub>2</sub>, 1; CaCl<sub>2</sub>, 1; HEPES, 10; Glucosa, 10 (pH7.4). Las corrientes de membrana fueron registrados en la configuración “whole- cell” usando un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments) y el software WCP V3.2. El voltaje fue fijado a -70 mV en todos los experimentos.

### Protocolo

Se añadió GABA por 5 segundos; agonistas (clordiazepóxido y pentobarbital) y antagonistas (bicuculina) a diferentes concentraciones.

## RESULTADOS

### DISTRIBUCIÓN DE SUBUNIDADES $\rho 1$ Y $\gamma 2$ EN EL SNC HUMANO

La expresión del RNAm de las subunidades  $\rho 1$  y  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>C</sub> y GABA<sub>A</sub> respectivamente, fue investigada en 6 regiones diferentes del SNC, las cuales son las susceptibles a lesiones de pacientes epilépticos: corteza frontal, corteza temporal, cerebelo, hipocampo, núcleo caudado y tálamo (Feria, 1997).

Una vez extraído el RNA total, se comprobó su integridad, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 8).

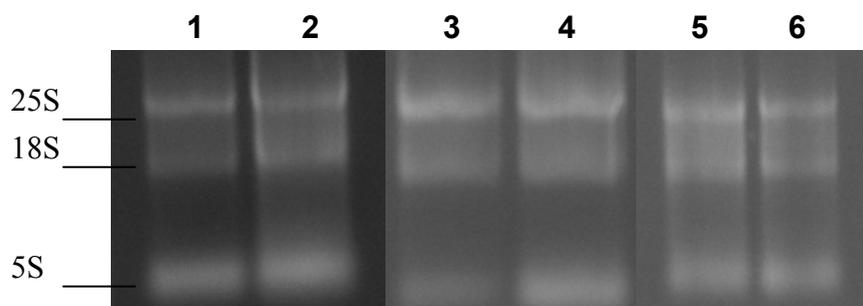


Figura 8. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa al 1% en el que se muestran los RNA totales de distintas áreas del SNC: 1) temporal, 2) frontal, 3) hipocampo, 4) cerebelo, 5) N. caudado, 6) tálamo.

Además, se determinó la concentración, calidad y pureza de las muestras mediante análisis espectrofotométrico (Tabla 2). El cálculo de la concentración se basa en que a una longitud de onda de 260 nm, una muestra de RNA con una densidad óptica de 1, tiene una concentración de 40  $\mu\text{g}$ . Por otro lado, la evaluación de la pureza y calidad se sustenta en que la razón de la absorbancia a 260 nm sobre la obtenida a 280 nm de una solución de RNA puro, es de 2.0 (Sambrook J. et al, 2001). En un total de 21 muestras de 4 individuos se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 19.

Tabla 19. Análisis espectrofotométrico de muestras de RNA total.

<b>Muestra</b>	<b>µg RNA/ g tejido</b>	<b>A260nm / A280nm</b>	<b>Concentración (µg/ µl)</b>
Temporal (5)	700±	1.4±	0.4±
Frontal (4)	576.92±	1.5±	0.9±
Núcleo Caudado (4)	1000±	1.7±	1.95±
Cerebelo (4)	905.88±	1.54±	3.3±
Hipocampo (4)	775±	1.55±	2±
Tálamo (4)	1100±	1.65±	2.55±

Los productos de los experimentos de RT-PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. (Fig. 9).

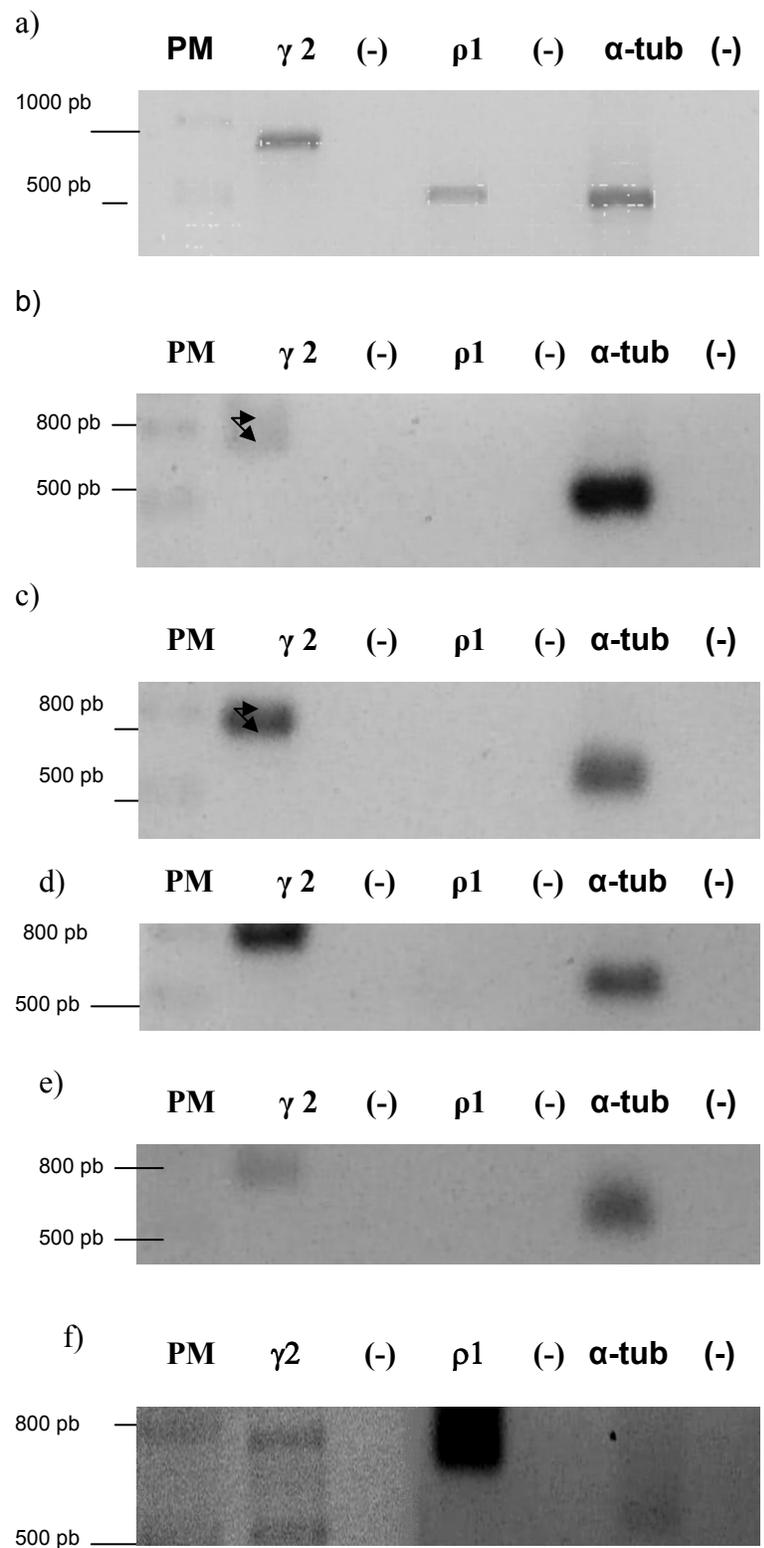


Figura 9. Amplificación por RT-PCR de los transcritos de GABA<sub>A</sub>  $\gamma 2$  y GABA<sub>C</sub>  $\rho 1$  de las diferentes áreas cerebrales estudiadas: a) cerebelo, b) corteza frontal, c) corteza temporal, d) tálamo, e) hipocampo, f) núcleo caudado.

En las bandas de RT-PCR obtenidas para la subunidad  $\gamma 2$  en cerebelo, corteza frontal y temporal se observan la presencia de dos bandas muy cercanas (Fig 12 a, b y c). Durante la realización de este trabajo se reportó en la literatura una subunidad  $\gamma 2$  originada de un evento de “splicing” alternativo que podría corresponder a esta segunda banda ; cabe notar que el evento de “splicing” reportado ocurre justo en la región amplificada en nuestros experimentos y el tamaño del producto correspondería también al encontrado (Jin et al, 2004) .

### INMUNOHISTOQUIMICA

Con el fin de determinar si la subunidad  $\gamma 2$  y  $\rho 1$  se expresan en el mismo tipo celular se realizaron inmunodetecciones en cortes coronales de cerebelo humano. Estos experimentos se realizaron en ésta área ya que: 1) los ensayos de RT-PCR sugieren que ambos genes se transcriben en el cerebelo, 2) experimentos realizados en paralelo en el laboratorio indican la presencia de receptores GABA<sub>c</sub> en esta área en bovino (López-Chavez en preparación) y, 3) durante el desarrollo de este trabajo se reportó que por hibridación *in situ*  $\rho 1$  y  $\rho 2$  son expresadas en el cerebelo de la rata (Rozzo et al, 2002) lo que corroboró lo reportado previamente en nuestro laboratorio (Martínez-Torres, 2000). Las subunidades  $\gamma 2$  y  $\rho 1$  se encontraron distribuidas en la línea de células de Purkinje, principalmente hacia los cuerpos celulares, aunque también se encontró marca de  $\gamma 2$  hacia la prolongación dendrítica de las mismas células (fig. 10)

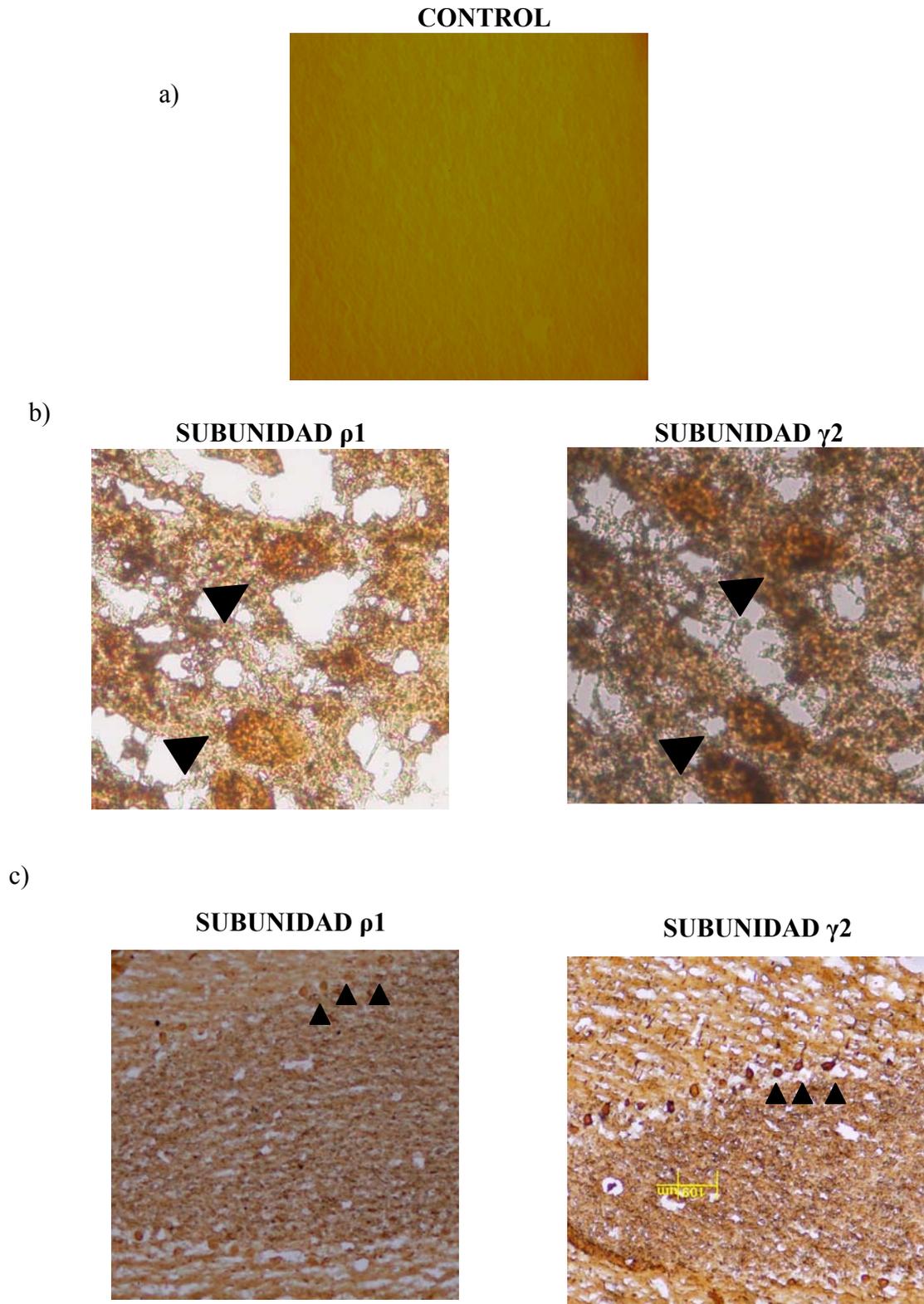


Figura 10. Fotografías de las inmunodetecciones realizadas en cerebelo: a) Control, b) subunidad  $\rho 1$  y  $\gamma 2$  (40X) c) subunidades  $\rho 1$  y  $\gamma 2$ . Las flechas indican algunas de las células inmureactivas

### Mutagénesis Sitio Dirigida Por La Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR).

Con el fin de generar la mutación K289M en la subunidad  $\gamma 2$  se realizaron una serie de PCRs para obtener dos productos: 1) portador de la mutación y 2) el extremo 5' complementario. Como se mencionó anteriormente y una vez obtenidos se llevó a cabo su ligación para obtener el DNAc completo.

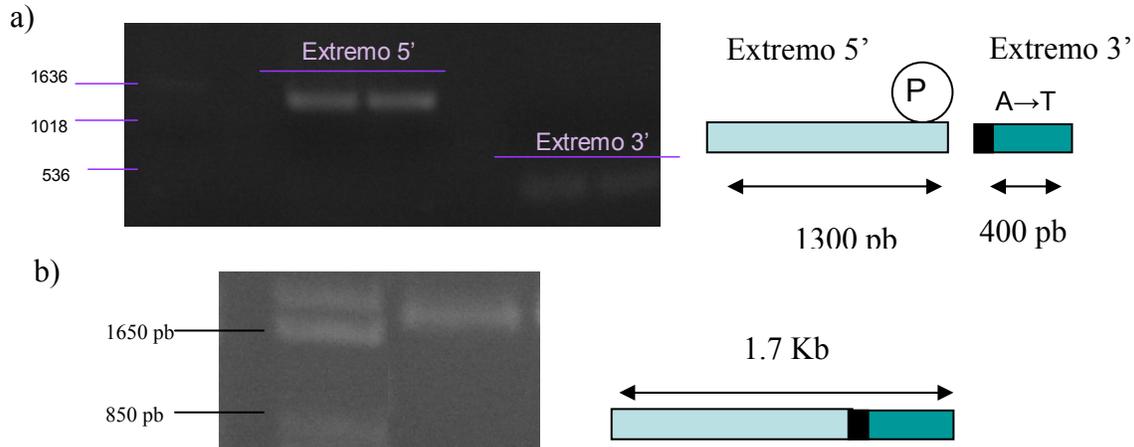


Figura 11. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en el que se muestran los dos productos de PCR que generaron la subunidad  $\gamma 2$  mutada (1.3 y 0.4 Kb) (a) y el producto ligado (1.7 Kb) (b).

### CARACTERIZACIÓN DEL PLÁSMIDO $\gamma 2_{K289M}$ -pCRTOPO

Para determinar si el plásmido contenía el DNAc que codifica para  $\gamma 2$  mutado, se llevó a cabo una caracterización enzimática con las enzimas que se muestran enseguida.

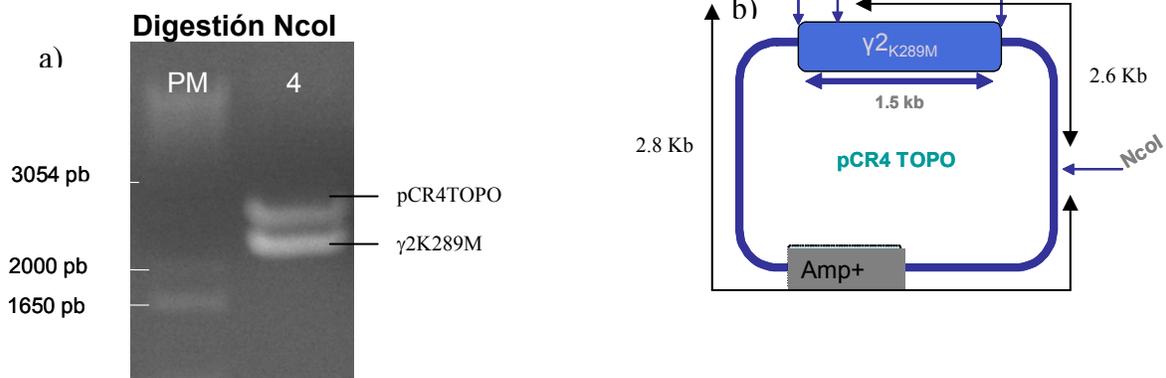


Figura 12. Fotografía de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en el que se muestran a) la digestión del plásmido  $\gamma 2_{K289M}$ -pCRTOPO con la enzima NcoI para la caracterización de las clonas obtenidas y b) mapa de restricción del mismo plásmido.

## SECUENCIACIÓN

La secuenciación nos permitió determinar si la mutagénesis sitio dirigida se había realizado correctamente. Se pudo lograr el cambio de una adenina por una tirosina.

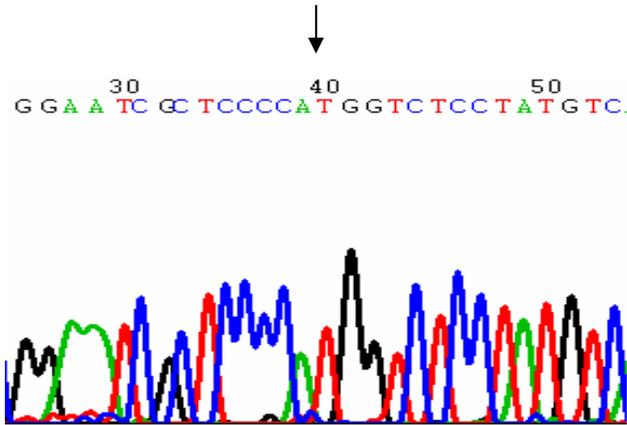


Figura 13. Trazo secuencia de  $\gamma 2$  mostrando la transición A→T que da lugar a la mutación K289M.

## CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE RECEPTORES GABA<sub>A</sub> SILVESTRE Y MUTANTE EN OVOCITOS DE *X. laevis*

Para determinar que los DNACs con los que es trabajaría en los ensayos funcionales se inyectó primeramente la subunidad  $\gamma 2$  silvestre en ovocitos. Está bien establecido que las subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub> no forman receptores homoméricos; sin embargo, contrario a lo que se esperaba se observaron corrientes del receptor homomérico de GABA<sub>A</sub>, y los receptores con mutaciones puntuales no generaron corrientes aún después de exponerse a 1mM de GABA.

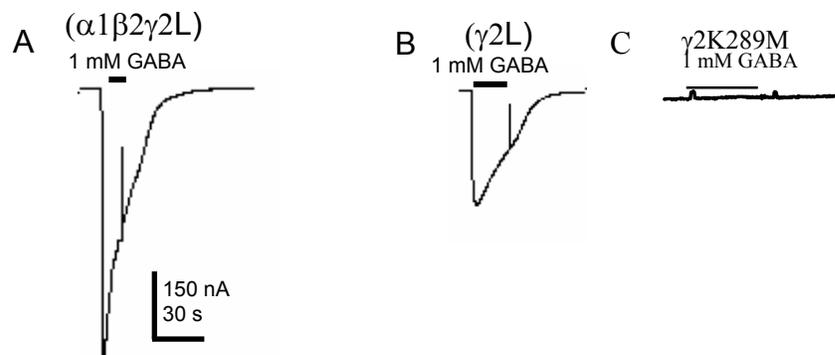
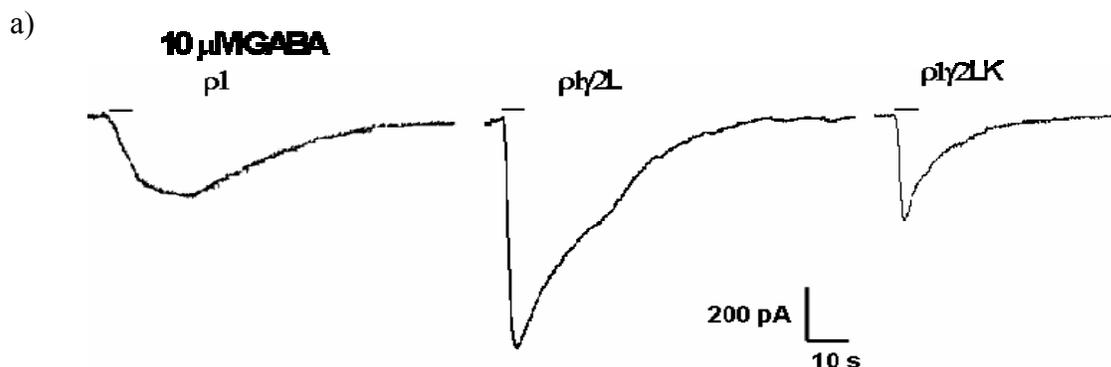


Figura 14. Corrientes generadas por GABA en ovocitos inyectados con receptores GABA<sub>A</sub>. A) Ovocitos inyectados con una combinación de DNAC de las subunidades  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L(1:1:1)$ . B) Ovocitos inyectados con el DNAC de la subunidad  $\gamma 2L$  sola. C) Receptor homomérico mutado ( $\gamma 2_{K289M}$ ) no generó corrientes.

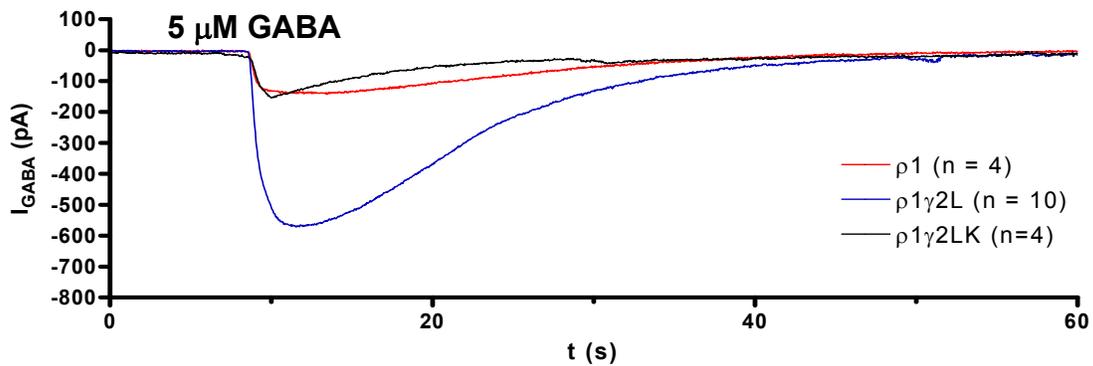
## CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE RECEPTORES $\rho 1\gamma 2L$ Y $\rho 1\gamma 2_{K289M}$ EN

### CÉLULAS HEK293

De la misma manera se llevó a cabo la caracterización de los receptores  $\rho 1\gamma 2L$  y  $\rho 1\gamma 2_{K289M}$  y como control la subunidad  $\rho 1$  en células HEK293 mediante la técnica de “whole cell” para determinar si estas subunidades son capaces de formar receptores funcionales. En una primera serie de experimentos, aplicamos el agonista natural GABA en concentraciones desde  $0.01 \mu M$  a  $3 \text{ mM}$  para las células que expresaban tanto receptores  $\rho 1$ ,  $\rho 1\gamma 2$ ,  $\rho 1\gamma 2K$  para poder determinar la  $EC_{50}$  para el agonista. Las células HEK293 de manera individual mostraron diferentes niveles de expresión de receptores, resultando en variaciones en la amplitud de las corrientes en respuesta a concentraciones de GABA. Sin embargo, la mayoría de las propiedades funcionales importantes que nosotros examinamos (cinética, sensibilidad relativa y coeficiente de Hill) no fueron afectados por el nivel de expresión de las subunidades. Los ejemplos de las corrientes producidas por GABA  $10 \mu M$  en células HEK293 expresando receptores  $\rho 1\gamma 2L$  y  $\rho 1\gamma 2K$  son mostrados en la figura 15a. Se observó una cinética de desensibilización más rápida en aquellas células que expresaron la subunidad  $\gamma 2$ ; sin embargo, su cinética de desactivación total tardó más tiempo en llegar a la línea basal de la corriente. La amplitud de las corrientes de los receptores formados por las subunidades  $\rho 1$  y  $\gamma 2L$  fueron mayores que las obtenidas por los receptores formados por las subunidades  $\rho 1$  y  $\gamma 2(K289M)$  (Fig. 15c).



b)



Peak =  $571.449 \pm 142.817$  pA, n = 10  
 $140.68 \pm 53.585$  pA, n = 4  
 $153.940 \pm 71.45267$  pA, n=4

c)

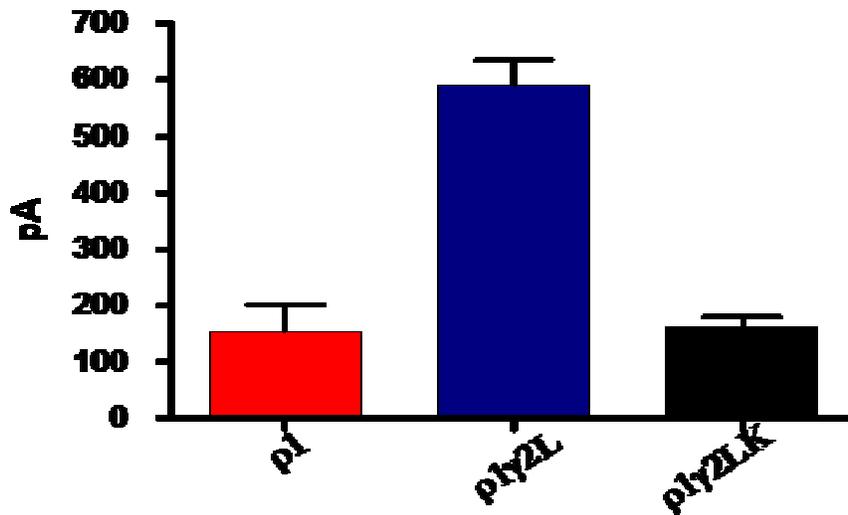


Figura 15. Caracterización de la cinética de los receptores  $\rho 1$ ,  $\rho 1\gamma 2\text{L}$  y  $\rho 1\gamma 2\text{K}289\text{M}$ . La subunidad  $\rho 1$  forma eficientemente receptores heteroligoméricos con la subunidad  $\gamma 2$ . a) Corrientes de  $\text{Cl}^-$  generadas después de 5s de aplicación de 10  $\mu\text{M}$  de GABA registradas en células HEK-293 transfectadas con cDNA de los receptores  $\rho 1$ ,  $\rho 1\gamma 2\text{L}$  y  $\rho 1\gamma 2\text{K}289\text{M}$ . b) y c) Amplitudes máximas medias de trazos registrados después de la aplicación de 5  $\mu\text{M}$  de GABA a células HEK-293 transfectadas con 1  $\mu\text{g}$  de cDNA para cada subunidad.  $P < 0.05$

Medimos la relación Dosis-Respuesta de GABA para obtener las concentraciones medias máximas de GABA (EC50) que fueron de 2.13  $\mu\text{M}$  para el receptor  $\rho 1\gamma 2\text{L}$ , de 7.96  $\mu\text{M}$  para  $\rho 1\gamma 2\text{K289M}$  y de 2.93  $\mu\text{M}$  para el receptor  $\rho 1$ . Mostrando que el receptor  $\rho 1\gamma 2\text{K289M}$  es el menos sensible a GABA (Fig. 16). De igual manera obtuvimos el número de Hill para determinar el número de moléculas de GABA que activan a cada receptor. Para el receptor  $\rho 1\gamma 2\text{L}$  fue de 1.53, para  $\rho 1\gamma 2\text{K289M}$  fue de 2.699 y de 1.076 para el receptor  $\rho 1$  (Fig. 16). También medimos la fase de decaimiento de los receptores a concentraciones de GABA 5  $\mu\text{M}$ , observando que los receptores cuya subunidad  $\gamma 2$  presenta la mutación son más rápidos para llegar a la línea basal (Figs. 17a-b).

Estudiamos también las características de estos receptores frente a fármacos moduladores de  $\text{GABA}_A$  (Fig. 18). Observamos que en la presencia de bicuculina, un antagonista de los receptores  $\text{GABA}_A$ , las corrientes generadas por los receptores formados por las subunidades  $\rho 1$  y  $\gamma 2$  tanto silvestre como mutada son inhibidas. Así mismo estudiamos el comportamiento de estos receptores frente a moduladores positivos de  $\text{GABA}_A$  como lo son el clordiazepóxido y el pentobarbital. En ninguno de los casos pudimos observar un efecto significativo sobre los receptores.

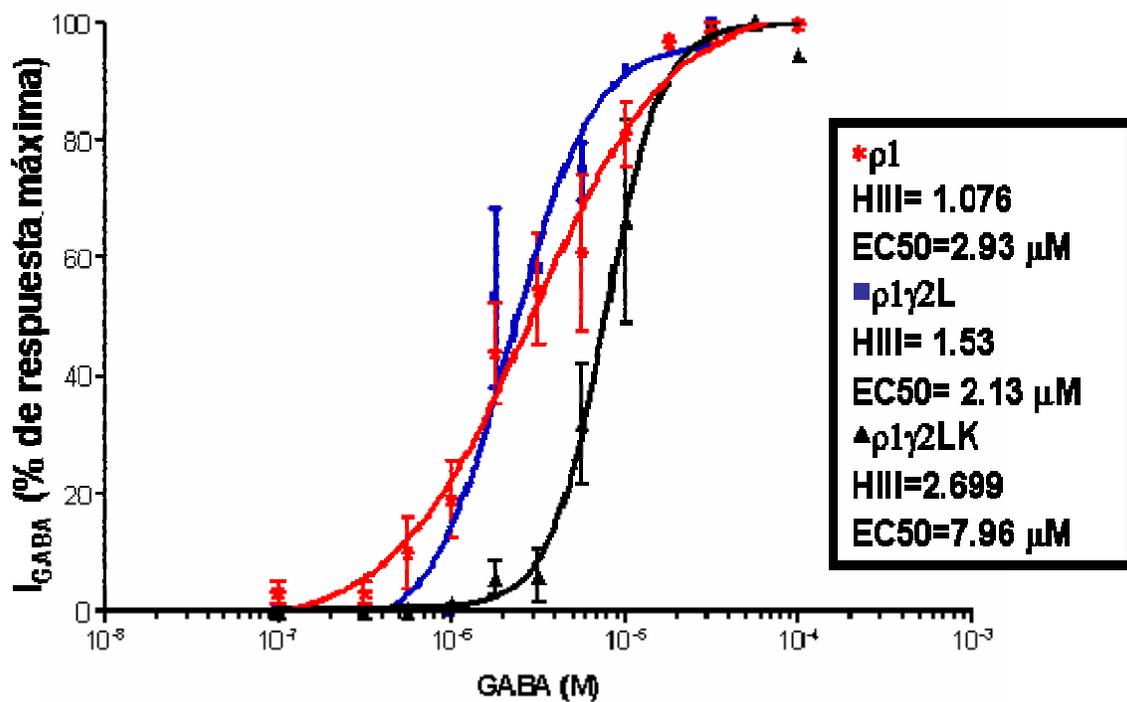


Figura 16. Relación Dosis-Respuesta de GABA. Concentraciones media de GABA ( $EC_{50}$ ) fue de 2.13  $\mu M$  para el receptor  $\rho 1\gamma 2L$ , de 7.96  $\mu M$  para  $\rho 1\gamma 2K289M$  y de 2.93  $\mu M$  para el receptor  $\rho 1$ .

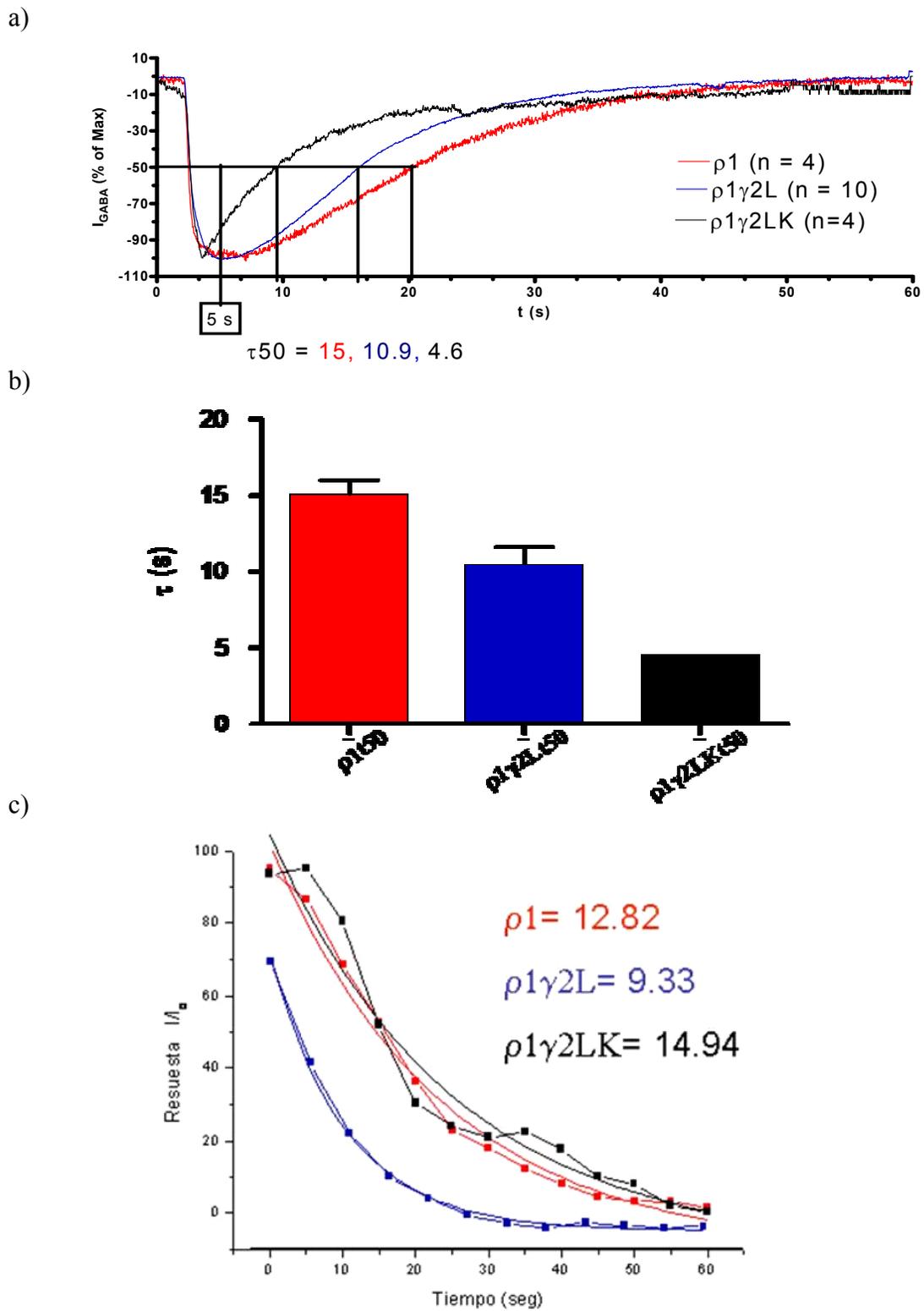
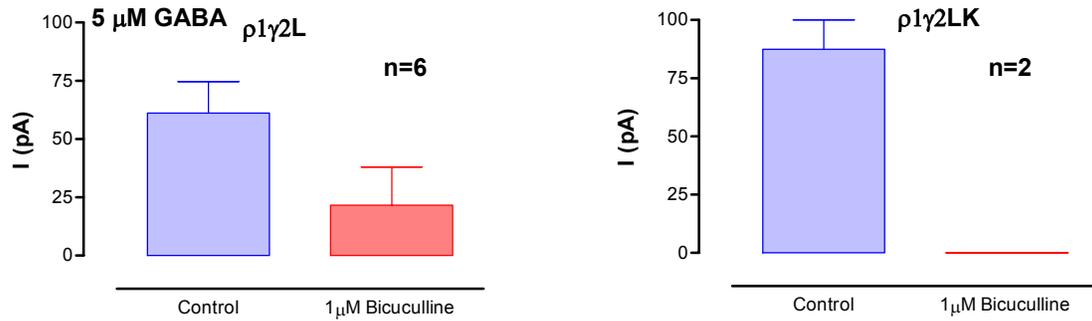
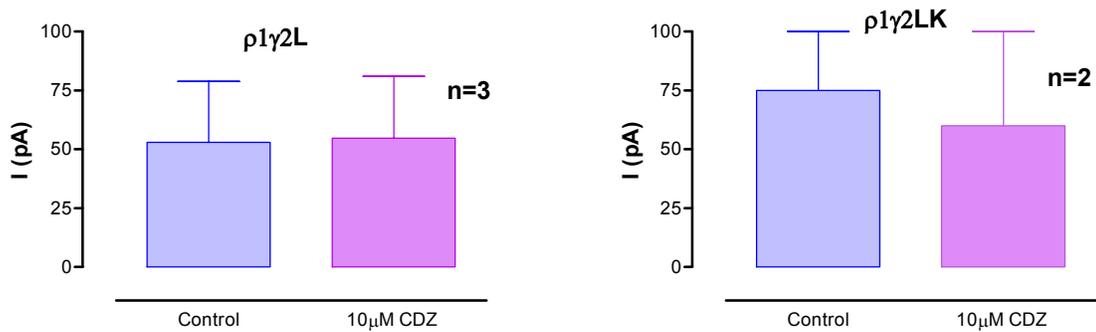


Figura 17. a) y b) Tasa media de decaimiento ( $\sigma$ ) para los receptores  $\rho 1$  (15),  $\rho 1\gamma 2L$  (10.9) y  $\rho 1\gamma 2K289M$  (4.6).  $P < 0.05$ . c) Cinética de desactivación para los receptores  $\rho 1$ ,  $\rho 1\gamma 2L$  y  $\rho 1\gamma 2K289M$ .

a)



b)



c)

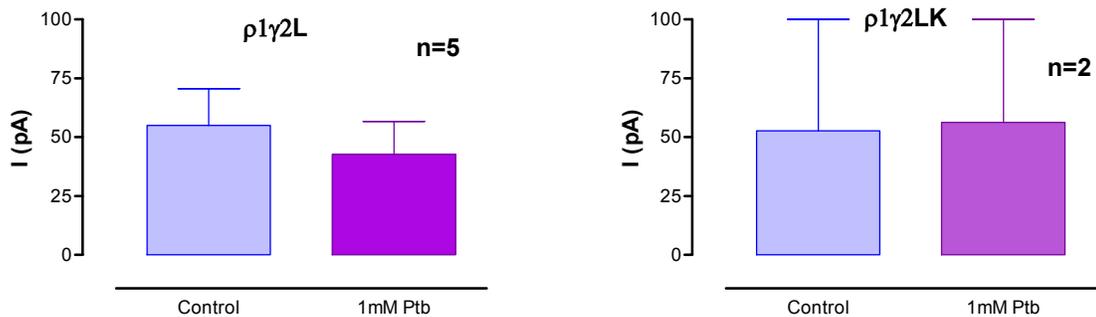


Figura 18. Farmacología para los receptores  $\rho 1$ ,  $\rho 1\gamma 2L$  y  $\rho 1\gamma 2K289M$ . a) La Bicuculina mostró un efecto antagónico sobre las corrientes en células HEK-293 expresando  $\rho 1\gamma 2L$  y  $\rho 1\gamma 2K289M$ . b) El Clordiazepóxido no afectó a ninguno de los receptores. c) Pentobarbital no tuvo ningún efecto sobre las corrientes en células HEK-293 expresando  $\rho 1\gamma 2L$  al igual de aquellas que estaban expresando  $\rho 1\gamma 2K289M$ .

## DISCUSION

Los receptores GABA ionotrópicos son inhibidores sinápticos críticos en el cerebro. Cada receptor puede estar formado por diferentes subunidades, y su composición define sus propiedades. Datos recientes soportan fuertemente la formación de receptores heteroméricos GABA que contienen subunidades de subfamilias de receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> (Ekema et al., 2002.). Nosotros mostramos por RT-PCR que las subunidades  $\gamma 2$  y  $\rho 1$  están expresadas tanto en cerebelo como en núcleo caudado humano. Además la técnica de inmunohistoquímica determinó la presencia de ambas subunidades en células de Purkinje del cerebelo. Este tipo celular ha sido involucrado en ataxia (Richardson, 2002).

Los registros electrofisiológicos en células transfectadas y ovocitos de *X. laevis* muestran que estos receptores heteroméricos presentan propiedades tanto de receptores GABA<sub>A</sub> como de GABA<sub>C</sub>, con una alta tasa de desensibilización y sensibilidad a GABA intermedia (Hartmann et al., 2004, Quian et al., 2002). Recientemente se han encontrado que existen un número creciente de mutaciones en subunidades de canales iónicos involucrados en epilepsia, como lo es en la Epilepsia Generalizada y Ataques Febriles “Plus” en donde una mutación en la subunidad  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> está involucrada, produciendo un decremento en la amplitud de las corrientes generadas por GABA y una inactivación más rápida del mismo en estudios funcionales desarrollados en ovocitos de *X. laevis*. Estas características conducirían a una duración más corta del potencial sináptico inhibitorio en las neuronas *in vivo* (Bianchi et al., 2002).

Nosotros hemos encontrado mediante los registros electrofisiológicos en células HEK293 que las subunidades  $\rho 1$  y  $\gamma 2$  son capaces de combinarse formando receptores funcionales con características mixtas tanto de receptores GABA<sub>A</sub> como de GABA<sub>C</sub>. Estos receptores son bloqueados por bicuculina como lo

encontrado *in vivo* por el grupo de Milligan y Hartmann (2004). De este modo la combinación de subunidades GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> sugiere que éstas podrían estar involucrados en GEFS+ debido a que, la mutación encontrada en  $\gamma 2$  en combinación con  $\rho 1$ , presenta amplitudes de corriente mucho menores a un receptor tipo silvestre  $\rho 1\gamma 2L$  así como una cinética de desactivación rápida, al igual que lo encontrado en receptores GABA<sub>A</sub> que contienen a la subunidad  $\gamma 2K289M$  (Baulac et al, 2001). Por tanto, pudiesen estar implicados fisiológicamente en una inhibición de la inhibición provocada por estos receptores.

Al mismo tiempo quisimos determinar mediante la técnica de RT-PCR y de inmunohistoquímica la región donde pudieran estar localizadas ambas subunidades para reforzar la posibilidad de coexistencia en un solo tipo de receptor. Encontramos que éstas están presentes en cerebelo, específicamente en las células de Purkinje principalmente en el soma.

Básicamente el cerebelo desempeña papeles importantes en las actividades motoras y en la rápida progresión de un movimiento al siguiente, también ayuda a controlar el interjuego instantáneo entre los grupos musculares agonistas y antagonistas. Esta estructura no causa ninguna sensación y rara vez produce algún movimiento motor. Sin embargo, la extirpación del cerebelo torna notablemente anormales todos los movimientos motores (Guyton, 2002). La unidad funcional de la corteza cerebelosa es la célula de Purkinje. Una de sus características de las células de Purkinje es que en condiciones normales descargan en forma continua para inhibir los núcleos profundos.

De igual manera, el núcleo caudado está involucrado en el control de patrones motores que están relacionados con la memoria de una experiencia previa debido a que recibe abundantes conexiones de la corteza cerebral implicadas principalmente de asociación cortical. El núcleo caudado como parte

del los ganglios basales interviene en la velocidad y el tamaño de cualquier movimiento que constituyen lo que se conoce como cronología y proporcionalidad. Ambas características se interrumpen en los pacientes que tienen lesiones en los ganglios basales. Esto está relacionado con el hecho de que la corteza parietal posterior (especialmente en el hemisferio no dominante), es el lugar donde se produce la coordinación espacial del cuerpo y su relación con el medio externo. Esta parte de la corteza está en íntima asociación con el núcleo caudado (Guyton, 2002).

En ratones mutantes con degeneración de células de Purkinje se afecta la madurez del cerebelo generando ataxia, anomalía clínica del cerebelo (Jeong et al, 2000; Kim et al, 2003). La ataxia es una alteración, parcial o total, de la coordinación muscular. Puede ser causada por un traumatismo o una enfermedad del sistema nervioso central. De acuerdo con esto y con nuestros resultados pensamos que estos posibles receptores híbridos podrían estar implicados en alteraciones cerebelosas originadas por mutaciones en estas subunidades. Sin embargo los registros electrofisiológicos que se han realizado en las células de Purkinje sólo han encontrado la presencia de receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> (Schmid et al, 1999; Itier et al, 1996; Than et al, 2002), mientras que no se han encontrado corrientes características de receptores GABA<sub>C</sub>. Se ha ido encontrando en los últimos años la presencia de corrientes diferentes a las características de aquellas presentadas por GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> en hipocampo (Martina et al 1995), pero gracias a estudios más recientes como los de Milligan (2004) y Hartmann (2004) podemos sugerir la posibilidad de receptores heteroméricos formados por subunidades GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> en hipocampo, a pesar de la presencia de pequeñas cantidades para el transcrito de las subunidades  $\rho$  (Didelon et al, 2002). De igual manera esperamos que próximos estudios aún más detallados puedan identificar la presencia electrofisiológica de estas subunidades en cerebelo.

Por otra parte las células GABAérgicas en el núcleo caudado están involucradas en la enfermedad de Huntington aunque el papel del receptor no ha

sido esclarecido (Guyton, 2002). Este es un trastorno hereditario que se caracteriza por espasmos en ciertas articulaciones, que se van extendiendo hasta el punto de afectar a todo el cuerpo. Esta enfermedad se piensa que es debida por la pérdida de neuronas secretoras de GABA y de acetilcolina. Nuestros estudios muestran que al igual que en el cerebelo los posibles receptores formados por las subunidades  $\rho 1$  y  $\gamma 2$  de  $GABA_C$  y  $GABA_A$  respectivamente, podrían estar implicados en ciertas patologías cerebrales cuando alguna de estas presentaran algún tipo de alteración como lo es una mutación puntual.

## CONCLUSIONES:

- Las subunidades  $\rho 1$  y  $\gamma 2$  están presentes en el cerebelo y núcleo caudado humanos.
- Las subunidades  $\rho 1$  y  $\gamma 2$  forman receptores heteroméricos funcionales cuando son expresados en células HEK293.
- Estas subunidades presentan alteraciones en su cinética cuando la subunidad  $\gamma 2$  presenta la mutación puntual K289M.
- Estas alteraciones en la cinética de un posible receptor formado por estas subunidades podrían estar involucrado en patologías cerebrales como la epilepsia GEFS+.

## REFERENCIAS

1. Barnard, E.A., Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A.N., Langer, S.Z. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. Review. *Pharmacol Rev.* 50(2):291-313. 1998
2. Baulac, S., Gourfinkel-An, I., Nabbout, R., Huberfeld, G., Serratosa, J., Leguern, E., Baulac, M. Fever, genes and epilepsy. *Lancet Neurol* 3:421-430. 2004.
3. Baulac, S.; Huberfeld, G.; Gourfinkel-An, I.; Mitropoulou, G.; Beranger, A.; Prud'home, J.-F.; Bulaz, M.; Brice, A.; Bruzzone, R.; LeGuern, E.: First genetic evidence of GABA<sub>A</sub> receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma-2-subunit gene. *Nature Genet.* 28: 46-48, 2001
4. Bianchi, M.T.; Song, L.; Zhang, H.; Macdonald, R.L. Two different mechanisms of disinhibition produced by GABA<sub>A</sub> receptor mutations linked to epilepsy in humans. *J Neurosci.* 22(13): 5321-5327, 2002
5. Boilleau, A.J.; Baur, R.; Sharkey, L.M.; Sigel, E.; Czajkowski, C. The relative amount of cRNA coding for  $\gamma$ 2 subunits affects stimulation by benzodiazepines in GABA<sub>A</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuropharm.* 43: 695-700, 2002
6. Boilleau, A.J.; Li, T.; Benkwitz, C.; Czajkowski, C.; Pearce, R.A. Effects of  $\gamma$ 2S subunit incorporation on GABA<sub>A</sub> receptor macroscopic kinetics. *Neuropharm* 44 : 1003-1012, 2003.
7. Bormann, J. The 'ABC' of GABA receptors. Review. *Trends Pharmacol Sci.* 21(1):16-9. 2000.
8. Boue-Grabot, E. Roudbaraki, M., Bascles, L., Tramu, G., Bloch, B., Garrret, M. Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J Neurochem.* 70:899-907. 1998.
9. Bowser, D.N.; Wagner D.A.; Czajkowski, C.; Cromer, B.A.; Parker, M.W.; Wallace, R.H.; Harkin, L.A.; Mulley, J.C.; Marini, C.; Berkovic, S.F.; Williams, D.A.; Jones, M. V. Altered kinetics and benzodiazepine sensitivity of a GABA<sub>A</sub> receptor

subunit mutation ( $\gamma 2(R43Q)$ ) found in human epilepsy. *Proc Natl Acad Sci*.99: 15170-15175.2002.

10. Chang, B.S., Loweinstein, D.H., Mechanisms of disease: *Epilepsy. N Engl J Med*. 349: 1257-66. 2003

11. Chang, Y., Weiss, D.S. GABA in the Nervous System: The view at Fifty Years, eds. Martin, D.L. y Olsen, R.W. 127-139. 2000

12. Chebib M, Johnston G. GABA-A activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *Journal of Medicinal Chemistry* 43: 1427-47.2000.

13. Chomczynski, P., Sacchi, N. Single- step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol- chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162 (1): 156-159. 1987

14. Connolly, C.N., Wooltorton, J.R.A., Smart, T.G., Moss, S.J. Subcellular localization of  $\gamma$ - aminobutyric acid type A receptors is determined by receptor  $\beta$  subunits. *Proc Natl Acad Sci* . 93: 9899-9904. 1996

15. 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., Uhl,G.R, Kazazian,Jr. H.H. Cloning of the  $\gamma$ - aminobutyric acid (GABA)  $\rho 1$  cDNA: A GABA receptor subunit highly expressed in the retina. 1991. *Proc Natl Acad Sci*. 88: 2673-2677.

16. Dibbens, L.M., Feng, H.J., Richards, M.C., Harkin, L.A., Hodgson, B.L., Scott, D., Jenkins, M., Petrou, S., Sutherland, G.R., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Macdonald, R.L., Mulley, J.C. GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet*. 13(13):1315-9. 2004.

17. Didelon, F., Sciancalepore, M., Savic, N., Mladinic, Bradbury, A., Cherubini, E. Aminobutyric Acid<sub>A</sub>  $\rho$  receptor subunits in the developing Rat Hippocampus. *J Neurosci Res*. 67:739–744. 2002

18. Ekema, G. M., Zheng, W., Lu, L., Interaction of GABA receptor/channel  $\rho 1$  and  $\gamma 2$  subunit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43 (7): 2326-2333. 2002
19. Enz, R. Brandstaetter, J.H., Hartveit, E., Waessle, H., Bormann, J. Expression of GABA receptor  $\rho 1$  and  $\rho 2$  subunits in the retina and brain of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1495-1501.1995
20. Enz, R.; Cutting, G.R. GABA<sub>A</sub> receptor  $\rho$  subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur J Neurosci.* 11: 41-50,1999.
21. Feigenspan, A., Wassle, H., Bormann, J. Pharmacology of GABA receptor Cl<sup>-</sup> channels in rat retinal bipolar cells. *Nature.* 14; 361(6408):159-62. 1993.
22. Feria Velasco, A., Martínez de Muñoz, D., Rubio Donnadieu, F.Epilepsia. Aspectos Neurobiológicos, médicos y sociales. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Departamento de Publicaciones Científicas. Cognos Editores S.A. de C.V. Primera Edición. México. 25-30.1997.
23. Feigenspan, A. y Bormann, J.Modulation of GABA<sub>C</sub> receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase. *J. Physiol.* 481:325-30.1994.
24. Felix, R., Channelopathies: ion channel defects linked to heritable clinical disorders.*J Med Genet* .37:729-740.2000
25. Gourfinkel-An, I., Baulac, S., Nabbout, R., Ruberg, M., Baulac, M., Brice, A., LeGuern, E. Monogenic idiopathic epilepsies. *Lancet Neurol.*3: 209-218.2004.
26. Guerrini, R., Csari, G., Marini, C. The genetic and molecular basis of epilepsy. *TRENDS mol Med.* 9 (7): 300-306. 2003.
27. Gutierrez-Delicado, E., Serratosa, J.M; Genetics of the epilepsies. *Curr Opin Neurol.* 17: 147-153, 2004.
- 28 Guyton, A.C., Hall, J.E. Fisiología Médica. McGraw-Hill. Interamericana. Décima Edición. España.2002
29. Hanley, J.G., Koulen, P., Bedford, F., Gordon-Weeks, P.R., Moss, S.J. The protein MAP-1B links GABA (C) receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature.* 397 (6714): 66-69. 1999.

30. Harkin, L.A., Truncation of the GABA<sub>A</sub> receptor  $\gamma$ 2 subunit is associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet.* 70: 530-536. 2002.
31. Hartmann, K., Stief, F., Draguhn, A., Frahm, C. Ionotropic GABA receptors with mixed pharmacological properties of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors. *Eur J Pharmacol.* 497: 139-146. 2004.
32. Harvey, R.J., Chinchetru, M.A., Darlisan, M.G. Alternative splicing of a 51-nucleotide exon that encodes a putative protein kinase C phosphorylation site generates two forms of the chicken  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor  $\beta$ 2 subunit. *J Neurochem.* 62:10-16. 1994
33. Hirose, S., Mohny, R.P., Okada, M., Kaneko, S., Mitsudome, A., The genetics of febrile seizures and related epilepsy syndromes. *Brain Dev.* 25 (5): 304-312. 2003
34. Itier, V., Depoortere, B., Scatton, B., Avenet, P. Zolpidem functionally discriminates subtypes of native GABA<sub>A</sub> receptors in acutely dissociated rat striatal and cerebellar neurons. *Neuropharm.* 35 (2): 137-145. 1996.
35. Jeong, Y.G., Hyun, B.H., Hawkes, R. Abnormalities in cerebellar Purkinje cells in the novel ataxic mutant mouse, pogo. *Brain Res Dev Brain Res.* 29;125(1-2):61-7. 2000.
36. Jin, P., Zhang, J., Rowe-Teeter, C., Yang, J., Stuve, L.L., Fu, G.K. Cloning and Characterization of GABA<sub>A</sub> receptor  $\gamma$ 2 subunit variant. *J Biol Chem.* 279 (2): 1408-1414. 2004
37. Kananura, C., A splice-site mutation in GABRG2 associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Arch Neurol.* 59: 1137-1141. 2002
38. Kaneko, S.; Okada, M.; Iwasa, H.; Yamakawa, K.; Hirose, S.; Genetics of epilepsy: current status and perspectives. *Neurosc Res.* 44: 11-30, 2002
39. Kapur, J. Role of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition in the pathogenesis of generalized seizures. *Exp Neurol.* 184 (1): 549-551. 2003
40. Karle, J.; Woldbye D.P.D.; Elster, L.; Diemer, N.H.; Bolwig, T.G.; Olsen, R.W.; Nielsen, M. Antisense Oligonucleotide to GABA<sub>A</sub> receptor  $\gamma$ 2 subunit induces limbic status epilepticus. *J Neurosc Res.* 54: 863-869, 1998.

41. Kim, K.H., Ha, J.H., Chung, S.H., Kim, C.T., Kim, S.K., Hyun, B.H., Sawada, K., Fukui, Y., Park, I.K., Lee, G.J., Kim, B.K., Lee, N.S., Jeong, Y.G. Glutamate and GABA concentrations in the cerebellum of novel ataxic mutant Pogo mice. *J Vet Sci.* 4(3):209-12. 2003.
42. Lerche, H., Jurkatt-Rott, K., Lehmann- Horn, F., Ion channels and Epilepsy. *Amer J Med Genet.* 106 : 146-159. 2001.
43. Macdonald, R.L., Bianchi, M.T.,Feng, H., Mutations linked to generalized epilepsy in humans reduce GABA<sub>A</sub> receptor current. *Exp Neurol.* 1884 (Suppl 1): 58-67. 2003.
44. Madia, F., Gennaro, E.,Cecconi, M., Buti, D., Capotilla, G., Dalla, B., Elia, M., Ferrari, A., Fontana, E., Gaggero, R., Giannotta, Melania., Giordano, L., Granata, T., La Selva, L., Lispi, M.L., Santucci, M., Vanadia, F., Veggiotti, P., Vigliano, P., Viri, M., Bricarelli, F. D., Bianchi, A., Zara, F. No evidence of GABRG2 mutations in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsy Res.* 53: 196-200.2003
45. Marini, C.; Harkin, L.A.; Wallace, R. H.; Mulley, J.C.; Scheffer, I.E.; Berkovic, S.F. Childhood absence epilepsy and febrile seizures: a family with a GABA<sub>A</sub> receptor mutation. *Brain.*126: 230-240.2003.
46. Martina, M., Strata, F., Cherubini, E. Whole Cell and Single Channel Properties of a New GABA Receptor Transiently Expressed in the Hippocampus. *J Neurophys.* 73 (2).1995.
47. Martinez Torres, 2000. Estudios funcionales y Moleculares en Receptores GABA<sub>C</sub>. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina. UANL
48. Meinardi, H., editor. Handbook Of Clinical Neurology. The Epilepsies. Elsevier Science. 72(28):1,3,5. 1999.
49. Meinardi, H., editor. Handbook Of Clinical Neurology. The Epilepsies. Elsevier Science. 73 (29): 1,3,5. 2000.
50. Metha, A.K. Ticku, M.K. An update on GABA A receptors. *Brain Res Rev.* 29: 196-217. 1999.
51. Milligan, C.J., Buckley, N.J., Garret, M., Deuchars, J., Deuchars, S.A. Evidence for inhibition Mediated by coassembly of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptor subunit in native central neurons. *J Neurosci.* 24 (33): 7241- 7250. 2004.

52. Nakayama, J., Hamano, K., Noguchi, E., Horiuchi, Y., Iwasaki, N., Ohta, M., Ankara, S., Naoi, T., Matsui, A., Arinami, T., Failure to find causal mutations in the GABA<sub>A</sub>- receptor  $\gamma$ 2 subunit (GABRG2) gene in Japanese febrile seizure patients. *Neurosci Lett.* 343: 117-120. 2003.
53. Nayeem, N., Green, T.P., Martin, L., Barnard, E.A. Quaternary structure of the native GABA<sub>A</sub> receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem.* 62 (2): 815-818, 1994
54. O'hara, B.F. Andretic, R., Heller, H.C., Carter, D.B., Kilduff, T.S. GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub>, and NMDA receptor subunit expression in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Brain Res Mol Brain Res.* 28(2): 239-250. 1995
55. Olsen, R.W., Tobin, A.J. Molecular biology of GABA<sub>A</sub> receptors. *FASEB J.* 4(5): 1469-1480. 1990
56. Pan, Z., Zhang, D., Zhang, X., Lipton, S., Evidence for coassembly of mutant GABA<sub>C</sub>  $\rho$ 1 with GABA<sub>A</sub>  $\gamma$ 2S, glycine  $\alpha$ 1 and glycine  $\alpha$ 2 receptor subunits *in vitro.* *Eur J Neurosci.* 12: 3137-3145. 2000
57. Polenzani L, Woodward R.M. y Miledi R. Expression of mammalian  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 88:4318-4322. 1991
58. Qian, H. y Dowling, J.E. Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature*, 361:162-164. 1993.
59. Qian, H.; Pan, Y. Co- assembly of GABA  $\rho$  subunits with the GABA<sub>A</sub> receptor  $\gamma$ 2 subunit cloned from white perch retina. *Mol Brain Res.* 103: 62-67, 2002.
60. Qian, H.; Ripps, H. Response kinetics and pharmacological properties of heteromeric receptors formed by coassembly of GABA  $\rho$ - and  $\gamma$ 2 – subunits. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 266 (1436): 2419-25. 1999.
61. Richardson, C.A., Leitch, B. Cerebellar Golgi, Purkinje, and Basket cells have reduced  $\gamma$ -aminobutyric acid immunoreactivity in stargazer mutant mice. *J comp neurol.* 453: 85-99. 2002.

62. Rozzo, A.; Armellin, M.; Franzot, J.; Chiaruttini, C., Nistri, A.; Tongiorgi, E.. Expression and dendritic mRNA localization of GABA<sub>C</sub> receptor p1 and p2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur J Neurosci.* 15: 1747-1758, 2002.
63. Rudolph, U.; Möhler, H.; Analysis of GABA<sub>A</sub> receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 44:475-498, 2004
64. Sambrook J, Russell DW. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor: New York.
65. Sarto, I., Wabnwgger, Lab.; Dögl, E. Segharte, W. Homologous sites of GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 1,  $\beta$ 3  $\gamma$   $\gamma$ 2 subunits are important for assembly. *Neuropharmacol* 43: 482-491, 2000
66. Scheffer I.E.; Berkovic, S.F. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain.* 120: 479-490. 1997.
67. Scheffer I.E.; Berkovic, S.F. The genetics of human epilepsy. *TRENDS pharmacol Sci.* 24 (8): 428-433. 2003.
68. Schmid, G., Chittolini, R., Raiteri, L., Bonanno, G. Differential effects of zinc on native GABA<sub>A</sub> receptor function in rat hippocampus and cerebellum. *Neurochem Int.* 34: 399-405.1999.
69. Schweizer, C.; Balsiger, S.; Bluethmann, H; Mansuy, I.M.; Fritschy, Jean-Marc ; Mohler, H.; Lüscher, B. The  $\gamma$ 2 subunit of GABA<sub>A</sub> receptor is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Mol cell neurosci.* 24: 442-450, 2003.
70. Semyanov, A., Kullmann, D.M. Relative picrotoxin insensitivity distinguishes ionotropic GABA receptor-mediated IPSCs in hippocampal interneurons. *Neuropharmacol.* 43: 726-736. 2002
71. Singh, R.;Scheffer, I.E.; Crossland, K.; Berkovic, S.F. Generalized epilepsy with febrile seizures: a common childhood onset genetic epilepsy syndrome. *Ann Neurol.*45:75-81.1999.
72. Steinlein, O.K. Genes and mutations in human idiopathic epilepsy. *Brain Dev.* 26: 213-218. 2004

73. Tan, N.C.K., Mulley, J.C., Berkovic, S.F. Genetic association studies in epilepsy: "The truth is out there". *Epilepsia*. 45 (11): 1429-1442. 2004.

74. Taylor, P.M., Connolly, C.N., Kittler, J.T., Gorrie, G.H., Hosie, A., Smart, T.G., Moss, S.J. Identification of residues within GABAA receptor  $\alpha$  subunits that mediate specific assembly with receptor  $\beta$  subunits. *J Neurosci*. 19 (15): 6360-6371. 1999.

75. Than, M., Szabo, B. Analysis of the function of GABAB receptors on inhibitory afferent neurons of Purkinje cells in the cerebellar cortex of the rat. *Eur J Neurosci*. 15: 1575-1584. 2002.

76. Wallace, R.H.; Wang, D.W.; Singh, R.; Scheffer, I.E.; George, A.L.; Jr, Phillips, H.A., Saar, K.; Reis, A., Johnson, E.W.; Sutherland, G.R.; Berkovic, S.F. ; Mulley, J.C. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup> channel  $\beta$ 1 subunit gene SCN1B. *Nature Genet*. 19: 336-370, 1998

77. Wallace, R.H.; Marini, C.; Petrou, S.; Harkin, L.A. ; Bowser, D.N. ; Panchal, R, G. ; Williams, D.A. ; Sutherland, G.R. ; Mulley, J.C. ; Scheffer, I.E.; Berkovic, S.F. Mutant GABA<sub>A</sub> receptor gamma-2- subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures. *Nature Genet*. 28: 49-52, 2001.

78. Whiting, P., McKernan, R.M., Iversen, L.L. Another mechanism for creating diversity in gamma- aminobutyrate type A receptors: RNA splicing directs expression of two forms of gamma2 phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci*. 87:9966-9970. 1990.

79. Woodward RM, Polenzani L, Miledi R. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. I. Effects of Cl<sup>-</sup> channel inhibitors. *Mol Pharmacol*. 42(1):165-73. 1992

80. Woodward RM, Polenzani L, Miledi R. Effects of hexachlorocyclohexanes on gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes by RNA from mammalian brain and retina. *Mol Pharmacol*. 41(6):1107-15. 1992

81. Woodward RM, Polenzani L, Miledi R. Effects of steroids on gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes by poly(A)<sup>+</sup> RNA from mammalian brain and retina. *Mol Pharmacol.* 41(1):89-103. 1992.