

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Campus Juriquilla

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL
DEL RECEPTOR QUIMÉRICO GABA_{cρ2}-GFP

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

(NEUROBIOLOGÍA)

P R E S E N T A :

GUSTAVO

MARTÍNEZ

DELGADO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES



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.

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular II, del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Ataúlfo Martínez Torres. Contando con una beca completa 181358 y apoyo 41309-Q del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); PAPIIT 228205 y 204806; y un donativo de la Academia de Ciencias del Tercer Mundo (TWAS).

DEDICATORIA

A MIS PADRES, IRENE Y ABRAHAM

A MIS HERMANOS, HERMAN Y ABRAHAM

AL SER, DE LA VIDA

AGRADEZCO

A MI FAMILIA

DR. CARLOS TREVIÑO BECERRA

A LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO

DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES

DR. RICARDO MILEDI Y DAU

DR. ALFONSO CÁRABEZ TREJO

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ

LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR II INB-UNAM

LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA CELULAR INB-UNAM

JURADO ASIGNADO

AMIGAS, AMIGOS, COMPAÑERAS

Y PROFESORES.

RECONOCIMIENTO

Quiero agradecer al **Dr. Ricardo Miledi** por la hospitalidad brindada en su laboratorio y por la enseñanza en mi formación, siendo una muestra de inspiración.

A la **Dra. Irma Alicia Martínez** (Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular II, INB-UNAM), por su valiosa ayuda, soporte técnico y apoyo proporcionado durante el proyecto; al **Dr. Carlos Saldaña** (Laboratorio de Neurofisiología Celular INB-UNAM), por su enseñanza, ayuda y sugerencias. Y a la **Dra. A. María López** (Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular II, INB-UNAM).

Al **Dr. Alfonso Cárabez** y el **Dr. Mauricio Díaz**, por la dedicación y enseñanza durante los Comités Tutorales.

A todos y cada uno de los integrantes del **Instituto de Neurobiología** de la **UNAM**. En especial a los integrantes de los laboratorios **D-15** y **D-13** por permitirme formar parte de un equipo, por todo lo aprendido y compartido.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A las Unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología; **Quím. Leonor Casanova, Yolanda, Magdalena y Carmen** (Enseñanza); **Ing. Elsa Nydia Hernández**; **M en C Leopoldo Flores** (Análisis de imágenes digitales); **Ht. Evelyn Flores** (Unidad de microscopía electrónica); **Psíc. Lourdes Lara** (Videoconferencia); **Bib. Rafael Silva, Bib. Ignacio Caballero, Bib. Pilar Galarza** (Biblioteca); **Dra. Anaid Antaramian** (Biología molecular).

Al **Dr. Agenor Limón** y **Dra. Analissa Bernarregui** (University of California, Irvine) por su hospitalidad y ayuda.

Al Jurado: **Dr. Rogelio Arellano Ostoá, Dr. Manuel Aguilar Ramírez, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez** y al **Dr. Alfonso Cárabez Trejo**. Por sus sugerencias y preparación final del manuscrito.

Finalmente, estoy particularmente agradecido con el **Dr. Ataúlfo Martínez-Torres**, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su paciencia, enseñanza, dedicación y gran disponibilidad para la realización del proyecto y continuación del mismo.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	3
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
II. ANTECEDENTES	5
<i>GABA</i>	5
<i>Síntesis</i>	5
<i>Función</i>	5
<i>Receptores</i>	6
III. RECEPTORES GABA_c	7
<i>Generalidades</i>	7
<i>Modulación</i>	8
<i>Subunidades ρ</i>	9
<i>Diversidad génica</i>	10
<i>Isoformas</i>	11
<i>Estructura</i>	12
<i>Distribución y función</i>	14
<i>Receptores homo y heteroméricos GABAρ</i>	16
<i>Co-ensamble</i>	16
IV. RECEPTOR GABA_c ρ2	17
<i>GABA ρ2</i>	17
V. JUSTIFICACIÓN	20
VI. HIPÓTESIS	20

VII. OBJETIVOS	21
<i>General</i>	21
<i>Particulares</i>	21
VIII. PERSPECTIVAS	22
IX. DISEÑO EXPERIMENTAL	23
X. MATERIAL Y MÉTODO	24
XI. RESULTADOS	38
XII. DISCUSIÓN	51
XIII. CONCLUSIONES	57
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	58
ABREVIACIÓN EMPLEADA	59
Apéndice A	60
Apéndice B	62
REFERENCIAS	63

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso puede transmitir señales de manera rápida y eficiente a través de una neurona. Estas señales eléctricas también son transmitidas directamente de célula a célula por medio de señales eléctricas por medio de sinapsis eléctricas o convirtiéndose en señales químicas a través de la liberación vesicular de neurotransmisores dentro de la hendidura sináptica. Las sinapsis químicas poseen receptores específicos para los neurotransmisores y pueden localizarse tanto en la pre y postsinapsis. Los receptores actúan como sistemas de transducción de señales, transformando señales químicas a eléctricas (*Cromer et al., 2002*). Los receptores para las distintas señales moleculares extracelulares son muy variados en cuanto a localización y función. Por un lado, pueden estar localizados en la membrana plasmática o bien, pueden formar parte de un complejo proteico intracelular (*Kandel et al., 2001*).

Los receptores localizados en la superficie celular o membrana citoplasmática se clasifican tres clases de acuerdo a los mecanismos de transducción de señal que utilicen: 1) los receptores acoplados a proteínas G, 2) los receptores acoplados a enzimas y 3) los receptores que forman canales iónicos (estos últimos denominados ionotrópicos). Los dos primeros actúan a través de la activación de una o varias vías intracelulares y son llamados metabotrópicos. Los últimos actúan directamente abriendo o cerrando su propio canal iónico (*Hille, 2001; Alberts et al., 2002; Zigmond et al., 1999*).

Los receptores ionotrópicos o canales iónicos activados por ligando se encuentran involucrados de forma esencial en la transmisión sináptica rápida entre células eléctricamente excitables. Cada receptor de esta clase es un multímero formado por una o varias subunidades y cada subunidad contiene dominios importantes para su función (*Purves et al., 1997; Zigmond et al., 1999*).

Los canales iónicos se agrupan en dos grandes tipos de acuerdo a la especie de ión que conducen o a su molécula ligando: 1) aquellos que son selectivos a aniones como por ejemplo los receptores a glicina, los GABA_A y los GABA_C, y 2) los selectivos a cationes, como por ejemplo los nicotínicos (nACh) y el receptor a serotonina (5HT₃) (*Keramidas et al., 2004*). En general, en vertebrados los primeros actúan como neuroreceptores inhibitorios en el SNC, mientras que los segundos lo hacen como excitatorios (*Le Novere y Changeux 1999*).

Para los receptores activados por el GABA, hasta el momento se han descrito dos receptores ionotrópicos denominados GABA_A y GABA_C; y uno metabotrópico denominado GABA_B. Los tres presentan distintas características moleculares, farmacológicas y funcionales. Pero mientras que los receptores GABA_A y GABA_B han sido investigados ampliamente, los GABA_C son los menos estudiados debido a su descubrimiento relativamente reciente (*Polenzani et al., 1991*). Por ende, hasta el momento la distribución tisular, localización celular y el significado funcional y/o fisiológico de los receptores GABA_C no se han esclarecido por completo.

Este trabajo tuvo la finalidad de contribuir al conocimiento del sistema GABAérgico, en especial de los receptores GABA_C. De manera que, mediante la combinación de técnicas de biología molecular, electrofisiología y microscopía de fluorescencia, se hizo la construcción y caracterización funcional de la fusión del receptor GABA_C-ρ2-GFP. Esta construcción molecular nos permitió iniciar una serie de estudios para elucidar y definir los mecanismos involucrados en el establecimiento del sistema GABAérgico, en particular del tráfico y ensamble de este receptor.

RESUMEN

El ácido γ -aminobutírico (GABA), es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central. Hasta el momento se han caracterizado tres tipos de receptores al GABA: GABA_A, GABA_B y GABA_C. Los receptores GABA_C están formados por subunidades tipo ρ (ρ 1- ρ 3). Estos receptores son insensibles a la bicuculina y al baclofeno y tienen una baja tasa de desensibilización.

En este trabajo se planteó la construcción, caracterización y localización celular del receptor quimera GABA bovino ρ 2 (b ρ 2), con la proteína verde fluorescente (GFP) La caracterización electrofisiológica de b ρ 2-GFP, utilizando la técnica de control de voltaje con dos microelectródos "voltage-clamp", mostró que la quimera b ρ 2-GFP, presenta propiedades similares a las reportadas para el receptor b ρ 2 silvestre. La fluorescencia de ovocitos de *X. laevis* que expresaban b ρ 2-GFP fue intensa y abundante en la superficie del hemisferio animal de la célula, observándose por microscopía confocal, una marcada fluorescencia intracelular en la misma zona. Cultivos primarios de cerebelo de rata y la línea celular HuTu 80 transfectados con b ρ 2-GFP, mostraron fluorescencia distribuida en el interior celular y homogéneamente esparcida en la membrana plasmática. Transfecciones en células HEK 293, evidenciaron principalmente una fluorescencia intracelular, siendo un poco más débil en la membrana plasmática.

Los resultados sugieren que el marcaje del receptor b ρ 2 con GFP no afecta considerablemente las características del receptor, por lo que se traduce y ancla eficientemente en la membrana plasmática. De esta manera b ρ 2-GFP, podría servir de plataforma para la observación del tráfico del receptor visualizado por microscopía confocal de fluorescencia en tiempo real, desde el sitio de traducción de la proteína, hasta su incorporación en la membrana plasmática.

ABSTRACT

γ -aminobutyric acid (GABA), is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. Three types of receptors to GABA have been characterized: GABA_A, GABA_B and GABA_C. The GABA_C receptors are part of the family of ionotropic receptors and are formed by ρ subunits (ρ 1- ρ 3). These receptors are insensitive to bicuculline and baclofen and they have a slow rate of desensitization.

The goal of this project was the construction, characterization and cellular localization of the bovine GABA ρ 2 (b ρ 2) receptor by expressing it as gene fusion with the green fluorescent protein (GFP). The electrophysiological characterization of b ρ 2-GFP using the "voltage-clamp" technique, showed that this receptor was similar as the wild-type b ρ 2. Fluorescence of frog oocytes expressing b ρ 2GFP subunit, was intense and more abundant near the cell surface in the animal hemisphere, confocal fluorescence microscopy showed a strong intracellular fluorescence. Primary culture of rat cerebellar neurons and HuTu 80 cell line, were transfected with b ρ 2-GFP. They showed fluorescence intracellularly distributed and homogeneously spread in the plasma membrane. Transfection in HEK 293 cells evidenced mainly intracellular fluorescence and a faint, non-uniform line of fluorescence reaching the plasma membrane.

These results suggested that tagging of the receptor with GFP does not affect considerably the characteristics of the receptor and that it is expressed and anchored efficiently into the plasma membrane. Thus, in future experiments the traffic of the receptor could be visualized, by using real time fluorescence microscopy tracking its route from the sites of protein translation to its final end at the plasma membrane.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta el momento no se sabe nada acerca del tráfico, mecanismo de distribución diferencial y/o de la regulación transcripcional del receptor ρ2. Excepto, que la regulación transcripcional de los genes ρ1 y ρ2 de las células bipolares de retina poseen promotores con elementos similares para su expresión dentro de las células bipolares, pero difieren en sus elementos de regulación fuera de ésta (*Wu y Cutting, 2001*).

Así como tampoco se han llevado a cabo estudios que determinen la vía y los mecanismos celulares y moleculares que subyacen al tráfico desde y hacia la membrana plasmática del receptor GABA_C bp2 y en general de los receptores GABA_C. La expresión heteróloga de este receptor, fusionado a una proteína fluorescente podría ayudar a esclarecer estos mecanismos, tal y como se ha reportado en estudios realizados a receptores a neurotransmisores y canales iónicos (*Martínez-Torres y Miledi, 2000; Palma et al., 2001*). Mostrando que la fusión de receptores ionotrópicos, como el GABA_Cρ1 con GFP, no afecta considerablemente sus propiedades funcionales (*Martínez-Torres y Miledi, 2001*), lo que ayudaría posteriormente, a determinar la ruta de transporte, vías de distribución y señalización del receptor GABA_Cρ2 recién traducido desde el complejo ribosomal hasta la membrana plasmática.

II. ANTECEDENTES

GABA

Los principales mediadores químicos en el sistema nervioso central son aminoácidos; como el glutamato, el GABA o la glicina. Actualmente, se considera al GABA como el neurotransmisor inhibitorio más importante en el cerebro. El descubrimiento de la inhibición sináptica directa mediada por este neurotransmisor, fue identificada en el cerebro de los mamíferos en la segunda mitad del siglo pasado (*Krnjevic' y Phillis, 1963*).

Síntesis

La síntesis de GABA, se lleva a cabo a partir de la actividad de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD). Esta presenta dos isoformas, la GAD65 y la GAD67, codificadas por dos genes distintos (*Zigmond et al., 1999*). El mecanismo de síntesis consiste en la remoción del grupo α -carboxilo del glutamato, liberando CO₂ y produciendo el ácido γ -aminobutírico (*Enna, 1997*).

Función

La función de GABA, que consiste en inhibir el potencial sináptico excitatorio de las neuronas, se lleva a cabo a través de la activación de receptores específicos que forman un canal permeable a Cl⁻, propiciando un potencial eléctrico más negativo en el interior celular (hiperpolarización), lo que favorece que sea más difícil el inicio de un potencial de acción. Sin embargo, se ha observado que en estados tempranos del desarrollo del SNC de mamífero, GABA actúa también como neurotransmisor excitador. Esto debido a una diferencia en el potencial de equilibrio de Cl⁻ producto de la falta de mecanismos de expulsión de Cl⁻ en estas etapas del desarrollo (*Thompson y Gahwiler 1989; Rivera et al., 1999; Stein y Nicoll, 2003*).

Receptores

Inicialmente, se encontró que GABA activa canales de Cl⁻ sensibles a bicuculina. Posteriormente, se describió también una activación mediada por GABA de canales catiónicos sensibles a baclofeno (*Bormann, 1988; Sivilotti y Nistri 1991*). Este hallazgo llevó a la noción de la existencia de dos tipos de receptores, designados receptores GABA_A y GABA_B. Estudios posteriores llevados a cabo por el grupo del Dr. Miledi, mostraron la expresión de un tipo de respuesta al GABA insensible a bicuculina y baclofeno al inyectar ARNm de retina de bovino en ovocitos de *Xenopus laevis* (*Polenzani et al., 1991; Woodward et al., 1992; 1993*). Así mismo, otro grupo reportó la clonación de la subunidad ρ1 de receptores GABA_C de una librería de ADNc de retina (*Cutting et al., 1991*).

Estos nuevos receptores fueron denominados GABA_C. Sin embargo, hoy en día la composición exacta de éstos, permanece en controversia y por esa razón y en un esfuerzo por clasificar los subtipos de receptores GABA, la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) propuso el uso del término GABA_{A0r}, para los receptores GABA_C. Especificando su insensibilidad a benzodiazepinas (0) y composición por subunidades ρ (r) (*Barnard et al., 1998*). Así, estos receptores se activan selectivamente por el ácido cis-2-aminometil ciclopropanocarboxílico (CAMP) (*Duke et al., 2000*) y son bloqueados por el ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridin-4 metilfosfínico (TPMPA) (*Murata et al., 1996; Ragozzino et al., 1996*).

III. RECEPTORES GABA_C.

Generalidades

El término de receptores GABA_C fue usado por primera vez para describir un nuevo sitio de unión en las membranas neuronales de retina (*Johnston, 1986*). Comparados con los receptores GABA_A, los receptores GABA_C se activan a concentraciones más bajas de GABA (EC₅₀ de entre 0.7 a 2 μM) y se desensibilizan muy poco, o nada aún después de estar expuestos al agonista por varios minutos (*Polenzani et al., 1991; Feingespán et al., 1993; Le Novère y Changeux 1999; Bormann, 2000*). Así mismo, los receptores GABA_C presentan una farmacología que los distingue de los receptores GABA_A. Son insensibles a bicuculina y no son modulados por los barbitúricos, las benzodiazepinas o esteroides neuroactivos (*Polenzani et al., 1991; Woodward 1992; 1993*).

Los receptores GABA_C son miembros de la superfamilia de los receptores “Cys-loop” o canales iónicos activados por ligando (LGIC). En los mamíferos, los “Cys-loop” comprenden tres subfamilias, que se dividen de acuerdo al número de pases transmembranales (TMs) que presentan. La primer familia comprende los receptores P2X activados por ATP con dos TMs; la segunda comprende a los canales catiónicos activados por glutamato incluidos: el N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido propiónico de α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y los receptores a kainato con tres TMs; y la tercera familia siendo la más grande con 4 TMs, incluye receptores a nicotina (nACh), receptores a glicina (Gly), serotonina (5-HT₃), a GABA (*EXP-1, GABA_A, GABA_C*), activados por zinc (*Gao y Jacobson, 2006*).

Los receptores GABA_C presentan un sitio de unión al agonista rico en amino ácidos aromáticos, pero mientras otros receptores de esta familia se unen a su agonista a través de una interacción catión-π a triptófano (Figura 1a), los receptores GABA_C se unen a GABA interactuando con una tirosina (*Carland et al., 2004; Lester*

et al., 2004; Harrison y Lummis, 2005; Lummis et al., 2005). De hecho, los residuos que forman la caja aromática en GABA_C son tirosinas (Figura 1b).

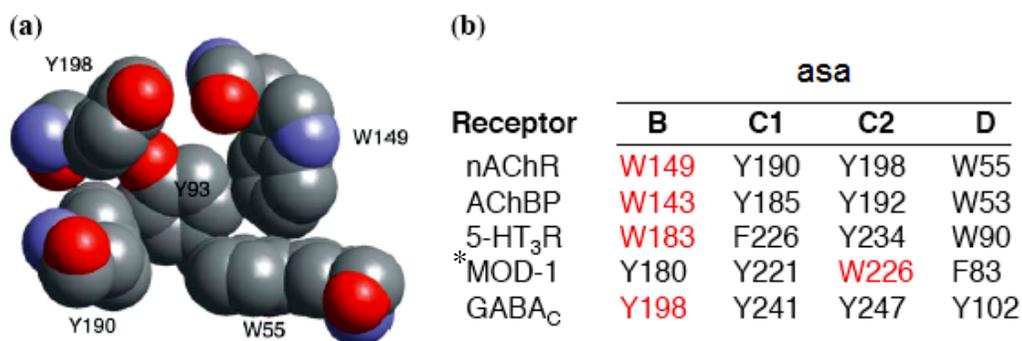


Figura 1. Residuos aminoacídicos del sitio de unión al ligando en los "Cys loop" (la numeración de los residuos esta basada en el de nAChR. a) Estructura de la caja aromática de la proteína de unión a acetilcolina (AChBP). b) Alineamiento de los residuos conservados en la caja aromática. Los residuos rojos representan los sitios de unión. *MOD-1 por sus siglas en inglés (modulation of locomotion defective), hace referencia a un nuevo canal receptor de serotonina en *C. elegans*.

Otra diferencia importante que distingue a los receptores GABA_C de otros receptores de la superfamilia "Cys-loop" incluidos los receptores de GABA_A, es que la BC₅₀ (constante media de unión) de GABA_C (0.65 μM) es muy semejante a su EC₅₀ (concentración media del agonista, que produce el 50% del efecto máximo observado) (0.81 μM), lo que puede explicar su baja desensibilización (Chang y Weiss, 1999) sugiriendo que el estado abierto del receptor GABA_C existe en un solo estado conformacional

Modulación

Los receptores GABA_C son alostéricamente modulados por una amplia variedad de entidades químicas, las cuales interactúan con distintos sitios de unión del receptor, ya sea inhibiendo o incrementando su respuesta. De esta manera, el Zn²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺ actúan como inhibidores y el Co²⁺, Ba²⁺, y Sr²⁺ como potenciadores

(*Calvo et al., 1994; Kaneda et al., 1997; 2000*). Se ha mostrado que los lantánidos pueden también modular a estos receptores (*Calvo et al., 1994; Goutman et al., 2005*); así mismo se ha mostrado un mecanismo de modulación dependiente de ATP para la subunidad ρ1 (*Filippova et al., 1999*).

Subunidades ρ

Se piensa que los receptores GABA_C consisten principalmente de las subunidades ρ y en su conformación homomérica se ensamblan de tal manera que están contruidos en un plano simple (*Lukasiewicz, 1996; Zhang et al., 2001*). Hasta el momento, sólo tres subunidades ρ han sido clonadas de retina de mamífero (ρ1, ρ2 y ρ3) y se ha demostrado en diferentes modelos de expresión heteróloga, que estas subunidades forman receptores homo y heteroméricos (*Shimada et al., 1992; Wang et al., 1994; Zhang et al., 1995; 2001; Enz y Cutting, 1999; Moss y Smart, 2001; López-Chavez et al., 2005*).

Diversidad génica

Muchos ADNc para las subunidades del receptor GABA han sido clonados de diferentes especies, mostrando estos genes una localización diferencial dentro del genoma (*Cutting et al., 1991; 1992; Zhang et al., 1995; Ogurusu et al., 1997; 1996; Greka et al., 1998*). Tres subunidades (ρ1, ρ2 y ρ3) han sido clonadas de humano y rata, mostrando un grado alto de homología entre las subunidades de rata (aproximadamente 92%), y entre las subunidades de humano (83%). Siendo su afinidad a GABA similar cuando son expresados como homómeros (*Wang et al., 1994; 1995*). Por otra parte, se ha descrito una homología en la secuencia de subunidades entre las tres subunidades ρ de distintas especies de alrededor de 60 a 74% (*Chebib 2004*).

Otra característica de los receptores GABA_C es que se relacionan filogenéticamente con los receptores GABA_A y con el receptor a glicina. Estudios de

probabilidad parsimonia-máxima y métodos de distancia de matriz que comparan las secuencias de las subunidades ρ, con las subunidades β y δ del receptor GABA_A, así como el hecho de que ninguno de los genes que codifican las subunidades ρ está localizado en el “cluster” de los genes que codifican GABA_A, sugieren que los GABA_C forman una rama separada filogenéticamente de los GABA ionotrópicos y que quizá los genes de las subunidades ρ, para los cuales se piensa comparten un antepasado común con las subunidades del receptor GABA_A, divergieron en una fase temprana en la evolución de la familia de “Cys loop” (Xue, 1998; Bormann, 2000).

En el humano, estas subunidades ρ han sido localizadas en cromosomas específicos. Los genes que codifican para los tres polipéptidos en el humano comprenden: ρ1 (GABRR1) con 10 exones; ρ2 (GABRR2) con 9 exones; y ρ3 (GABRR3) con 9 exones. ρ1 y ρ2 se localizan, en el cromosoma 6 y ρ3 en el cromosoma 3q11-q13. Este hecho podría apoyar la idea de una divergencia filogenética, debido a que los genes que codifican para ρ1 y ρ2 se localizan en la misma región cromosomal mientras que el gen que codifica para la subunidad ρ3 se localizan en otro (Cutting *et al.*, 1992; Bailey *et al.*, 1999). Se ha sugerido que ρ3 parece haber divergido relativamente temprano, mientras que ρ1 y ρ2 parecen haber divergido después de una duplicación de un gen ρ progenitor (Cutting *et al.*, 1992; Bailey *et al.*, 1999).

Con respecto a las subunidades ρ clonadas de retina de la perca blanca y basándose en una alineación aminoacídica, se encontró que presenta dos miembros de cada grupo de subunidades ρ1 y ρ2: ρ1A, ρ1B, ρ2A, y ρ2B (Pan y Qian, 2005), Observándose que una quinta subunidad ρ (ρ3), no forma un receptor funcional cuando es expresada en ovocitos de *Xenopus* (Pan *et al.*, 2005).

Estos subtipos de subunidades ρ, despliegan una extensa homología de secuencia con otras subunidades ρ como la observada entre ρ1 y ρ2 de retina de

mamífero. Esto sugiere que la rama filogenética de las subunidades ρ podría ser considerada cercana al arquetipo de los receptores GABA (Qian et al., 1997), debido a que muchas subunidades de los receptores GABA de invertebrados son intermedios evolutivos en lugar de subunidades definidas de receptores GABA_A como ha sido propuesto por Barnard (1998) y Xue (1998).

Isoformas

Sólo se han descrito variantes alternativas que fueron clonadas de una biblioteca de ADNc de retina humana (Martínez-Torres et al., 1998). Estos transcritos muestran una delección en el N-extracelular (ambos en la misma posición aminoacídica (S35), después del péptido señal). La primera forma alternativa (GABA ρ 1 Δ 51), representa una delección de 17 aminoácidos y cuando es expresado en ovocitos de *Xenopus*, se observan características funcionales básicas, similares a la subunidad ρ 1 del tipo silvestre, aunque esta variante alternativa reveló una sensibilidad más alta hacia GABA y Zn²⁺ (Demuro et al., 2000). La segunda isoforma (GABA ρ 1 Δ 450), tiene una delección de 150 aminoácidos y en contraste con la primera, no es funcional. Sin embargo, la proteína correspondiente, presenta un tráfico e incorporación correcto en la membrana de la célula, como se demostró mediante una fusión con la proteína GFP; sugiriéndose que tal vez actúa en una vía regulatoria (Martínez-Torres et al., 2001). Aunque, las formas alternativas incrementan el potencial de codificación de esta familia de genes expresados en la retina, hasta el momento la diversidad funcional creada por estas variantes no ha sido esclarecida (Martínez-Torres et al., 1998).

Estructura

Los receptores GABA_C, funcionan como un supuesto arreglo pentamérico. Siendo comúnmente aceptado el modelo de la topología transmembranal de las subunidades ρ, basado en los estudios del receptor de nAChR (*Unwin, 1995*).

Se ha sugerido que cada subunidad tiene un dominio extracelular el cual se une al ligando (Figura 1), y dominios transmembranales que consisten en cuatro segmentos (M1-M4), que cruzan la membrana. Siendo el segundo segmento transmembranal (M2), el que forma el poro del canal iónico, el cual es alineado por residuos dentro de cada subunidad Figuras 2 y 3 (*Leonard et al., 1988; Akabas et al., 1992; Xu y Akabas, 1993, 1996; Miyazawa et al., 2003*).

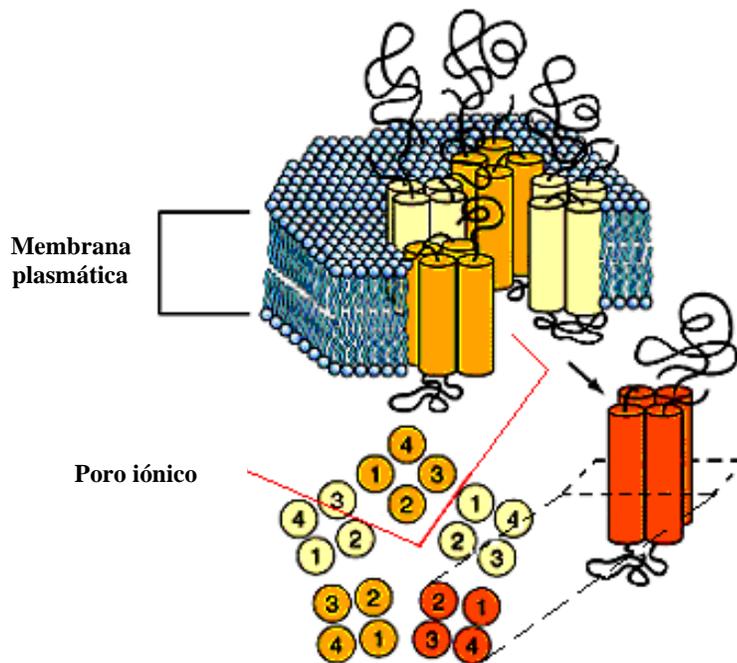


Figura 2. Diagrama esquemático de los receptores GABA_C. Estos receptores presentan un arreglo pentamérico, es decir, son formados por cinco subunidades, con un canal ó poro iónico en el centro del receptor. 1-4 representan los cuatro pases transmembranales de cada una de las cinco subunidades

Trabajos recientes han mostrado que los residuos finales del segundo segmento transmembranal entre las posiciones -3' y 2' forman el filtro de selectividad del ión de estos receptores (Carland et al., 2004).

Sin embargo, hasta el momento ninguna estructura de receptores "Cys-loop" se ha resuelto a nivel atómico, excepto, la estructura de una proteína homóloga al dominio extracelular del receptor de nACh, la proteína de unión de acetilcolina (AChBP), la cual es relativamente similar a los receptores de GABA (Katjusia et al., 2001).

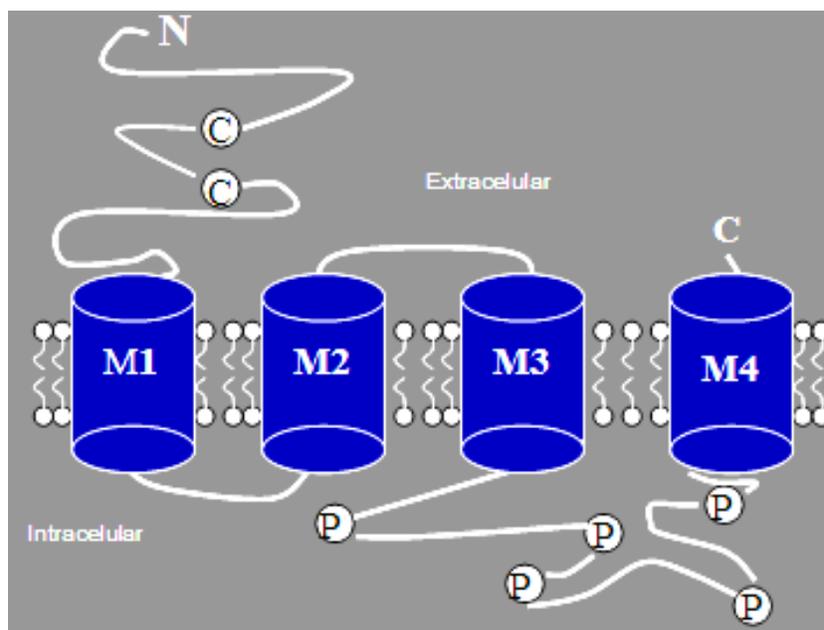


Figura 3. Modelo topológico de las subunidades de receptores GABA_C. Las subunidades de los receptores GABA_C se supone están formadas por un dominio amino (N) terminal extracelular en donde se localiza el sitio de unión al agonista y dos residuos de cisteína (C), que forman un asa intramolecular necesaria para la formación de un receptor funcional, 4 dominios transmembranales (M1-M4), en donde el segundo dominio transmembranal (M2), forma la pared del canal iónico, el cual es un canal de Cl⁻ que presenta un tiempo medio de apertura de 150 a 200ms y una conductancia de 7 a 8pS; y dos asas intracelulares, una conecta al primer y segundo segmentos transmembranales y la segunda asa al tercer y cuarto dominios transmembranales. La segunda asa contiene señales de modificación postraduccional entre las cuales se encuentran señales para la fosforilación por una enzima proteína cinasa (señaladas como P en la figura).

Este modelo sugiere que existen algunas diferencias importantes entre los receptores nACh y los de GABA_C. Sin embargo, ha mostrado ser sumamente útil para el estudio del dominio extracelular del receptor (*Cromer et al., 2002; Le Novère et al., 2002; Schapira et al., 2002; Maksay et al., 2003; Reeves et al., 2003*).

Distribución y Función

Durante los últimos años, los receptores de GABA_C han sido descritos en retina de diferentes especies. En células bipolares de rata (*Feingenspan et al., 1993; Feingenspan y Bormann, 1994; Enz et al., 1995; Ogurusu et al., 1995; Pan y Lipton, 1995; Zhang y Slaughter, 1995 Euler et al., 1996; Yeh et al., 1996; 1997; Albrecht et al., 1997*); células horizontales de peces (*Quian y Dowling, 1993, 1995; Dong et al., 1994; Takahashi et al., 1994*) en dendritas y terminales axónicas de células bipolares de salamandra y hurón (*Lukasiewicz y Werblin, 1994; Dong y Werblin, 1998; Lukasiewicz y Shields, 1998; Shields et al., 2000*); gato y carpa dorada (*Koulen et al., 1997*); ardilla (*O'Hara et al., 1995*); pollo (*Albrecht et al., 1995; Albrecht et al., 1997*); conejo y macaco (*Enz et al., 1996*); vaca (*Cutting et al., 1991; O'Hara et al., 1995; López-Chávez et al., 2005*) y retina de anfibio (*Dong et al., 1994; Wegelius et al., 1998*).

Los receptores GABA_C se distribuyen en abundancia principalmente en la retina y particularmente hacia el axón de células bipolares, en donde se describe que los receptores GABA_C reciben aferentes de las células amacrinas (*Feingenspan et al., 1993*). Esta activación inhibe la liberación de glutamato hacia las células ganglionares y amacrinas, modulando el rango dinámico, resolución temporal, y el contraste espacial de la respuesta de la retina a estímulos visuales. Participando por ende, en la formación de la imagen visual por la extracción espacial de representaciones neuronales en tiempo (*Dong y Werblin, 1998*) y espacio (*Enz et al., 1995; Wellis y Werblin, 1995; Euler y Masland, 2000; Boue-Grabot et al., 1998; Enz y Cutting, 1999; Roska et al., 2000; Shields et al., 2000*).

Por otra parte, se ha reportado que las subunidades ρ se expresan en otras áreas del SNC. Datos que concuerdan con los descritos por el grupo del Dr. Miledi años atrás y en donde realizando ensayos de inyección de ARN poli A de las subunidades GABA_C de cerebelo de bovino en ovocitos de *Xenopus laevis*, se describieron corrientes activadas a concentraciones bajas de GABA resistentes a bicuculina y antagonizadas por TPMPA (López-Chávez et al., 2005).

Actualmente, estas subunidades GABA ρ se describen en cerebelo, hipocampo, colículo superior, núcleo accesorio del sistema visual, pretectum, hipófisis, núcleo geniculado dorsal lateral, raíz dorsal del ganglio y espina dorsal (Cutting et al., 1991; Albrecht et al., 1997; Boue-Grabot et al., 1998; Wegelius et al., 1998; Alakuijala et al., 2005ab; López-Chávez et al., 2005). Hallazgos que concuerdan con los realizados anteriormente por inmunohistoquímica, RT-PCR, hibridación *in situ*, “Northern blots” y ensayos electrofisiológicos, donde se muestra la expresión del ARNm subunidades ρ fuera de la retina. Siendo la expresión del ARNm de ρ2 en el cerebro más abundante que el ARNm de las subunidades ρ1 o ρ3 (Boue-Grabot et al., 1995; Enz et al., 1995; O’Hara et al., 1995; Ogurusu et al., 1995; 1997; Albrecht et al., 1997; 1998; Enz y Cutting, 1999).

De esta manera, se ha evidenciado la expresión funcional de estos receptores no solo en el SNC, sino también en tejidos periféricos (Akasu et al., 1999; Jansen et al., 2000) y sus roles podrían tentativamente incluir tanto procesos visuales, regulación de los ritmos sueño-vigilia, percepción del dolor, memoria, aprendizaje regulación de secreción hormonal y secreción neuroendocrina gastrointestinal (Johnston, 2002).

Receptores Homo y Heteroméricos GABA_ρ

Por otra parte, se ha descrito una co-localización en la expresión de las subunidades ρ en diversos tejidos, lo que podría indicar lo que previamente se había sugerido, es decir, la existencia de receptores homo y heteroméricos GABA_C (*Boue-Grabot et al., 1998; Enz et al., 1999; Alakujala et al., 2005 a, b; Liu et al., 2004*).

Co-ensamble

Diversos estudios sugieren que los GABA_C, no solo pueden formar receptores homo y heterooligoméricos de subunidades ρ, sino que también pueden co-ensamblarse con subunidades GABA_A (α 1, β 2, and γ 2) ó con subunidades del receptor a glicina (α 1, α 2 y β), para formar receptores heteroméricos (*Qian y Pan, 2002*). Siendo el dominio N- terminal (70 aminoácidos) de las subunidades ρ, responsable de mediar dicho co-ensamble (*Hackman et al 1997; Enz y Cutting, 1999*;). Estos co-ensambles, mostraron propiedades electrofisiológicas más cercanas a los receptores GABA_C de la retina que cualquier receptor GABA ρ homomérico (*Qian y Pan, 2002*).

Así mismo, se ha sugerido que las subunidades ρ pueden co-ensamblarse no sólo con miembros de la familia de los “Cys loop” para formar receptores heteroméricos (*Milligan et al., 2004; Qian y Pan, 2002*), sino también con receptores de tipo excitatorio (P2X2), mostrándose que P2X2 y ρ1 despliegan una co-localización en el cordón dorsal de la médula espinal (*Vulchanova et al., 1997; Zheng et al., 2003*); hipocampo (*Kanjhan et al., 1999*), cerebelo (*Stojilkovic et al., 2000*), pituitaria anterior (*Boue-Grabot et al., 2000*) y retina (*Koulen et al., 1998*).

IV. RECEPTOR GABA_cp2.

GABA p2

En los años 90's Cutting y colaboradores, por medio de un ensayo de tamizaje que realizaron a una librería de ADN genómico, obtuvieron dos clonas distintas. Una de ellas contenía un solo exón del gen p1, mientras la segunda abarcaba un exón con un 96% de identidad con p1. Posteriormente, amplificando la biblioteca del ADNc de retina humana con oligonucleótidos específicos para el exón de la segunda clona obtenida, identificaron un ADNc de 3-kb con un marco de lectura abierto de 1,395 bp. La secuencia aminoacídica predicha mostró tener un 30 a 38% de similitud con las subunidades α , β , γ y δ del receptor GABA_A y una similitud del 74% con la subunidad p1, sugiriendo que el ADNc codificaba un nuevo miembro de la familia de receptores GABA_p. El cual fue denominado GABA_p2 (Cutting *et al.*, 1992).

La subunidad GABA_p2, es codificada por el gen GABRR2 localizado en el cromosoma 6 humano (6q13-q16.3) (Bailey *et al.*, 1999), en un arreglo en tándem con la subunidad p1 (Figura 4).



Figura 4. Localización en el cromosoma 6 humano de los genes GABRR1 y GABRR2 que codifican las subunidades GABA p1 y p2, evidenciado por la línea perpendicular roja al cromosoma. CEN (centrómero)

El ARNm consta de 1628 bases y su secuencia codificante consiste de la base 81 a la 1478. El dominio amino terminal extracelular del receptor consiste de la base 264 a la 863 y los cuatro dominios transmembranales de la base 882 a la 1463 (Cutting *et al.*, 1992; Bailey *et al.*, 1999). Hasta el momento no se han descrito variantes alternativas para esta subunidad.

Trabajos de mutación sitio-dirigida, muestran que el residuo serina 320 del segundo segmento transmembranal del receptor, es un determinante importante en la cinética y farmacología de esta subunidad. Así como que la región del segundo segmento transmembranal (metionina en lugar de treonina en el residuo 314) es responsable de la resistencia a picrotoxina (PTX), en el receptor silvestre de rata (*Zhang et al., 1995*).

Ensayos de expresión heteróloga de la subunidad ρ2 clonada de retina de mamífero, muestra que forma receptores funcionales homo y heterooligoméricos con ρ1 en ovocitos de *Xenopus laevis* (*Zhang et al., 1995*). Como homómero y en su expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus*, el receptor GABA_Cρ2 de bovino mediante la aplicación de GABA 10 μM presenta una respuesta con una amplitud de corriente máxima promedio de 728 nA, con una EC₅₀ de 1.19 μM ± .049 y coeficiente de Hill en el rango de 2.17 ± 0.15 (*López-Chávez et al., 2005*)

GABA_Cρ2 se encuentra principalmente en la vía visual, pero también en otras áreas del SNC como colículo superior, corteza, cerebelo, hipocampo, médula espinal, interneuronas, células gliales como oligodendrocitos, en motoneuronas e interneuronas de la médula espinal de rata (*Rozzo et al., 2002; López-Chávez et al., 2005; Alakuijala et al., 2005 a, b*). Estos hallazgos sugieren, que la expresión de receptores GABA_C en la médula espinal, se extiende hacia niveles más superiores, en donde probablemente pueda expresarse también en las motoneuronas de los nervios craneales (*López-chavez et al., 2005*).

Este patrón de distribución diferencial del receptor ρ2 en comparación con las subunidades ρ1 y ρ3 posiblemente es debido a una diferencia en la regulación transcripcional de estas subunidades (*Wu y Cutting, 2001*). Sin embargo, hasta el momento no se sabe nada acerca del tráfico, mecanismo de distribución diferencial y/o de la regulación transcripcional del receptor ρ2. Excepto, que la regulación transcripcional de los genes ρ1 y ρ2 de las células bipolares de retina poseen promotores con elementos

similares para su expresión dentro de las células bipolares, pero difieren en sus elementos de regulación fuera de ésta (*Wu y Cutting, 2001*).

Así como tampoco se han llevado a cabo estudios que determinen la vía y los mecanismos celulares y moleculares que subyacen al tráfico desde y hacia la membrana plasmática del receptor GABA_C ρ2 y en general de los receptores GABA_C. La expresión heteróloga de este receptor, fusionado a una proteína fluorescente podría ayudar a esclarecer estos mecanismos, tal y como se ha reportado en estudios realizados a receptores a neurotransmisores y canales iónicos (*Martínez-Torres y Miledi, 2000; Palma et al., 2001*). Mostrando que la fusión de receptores ionotrópicos, como el GABA_Cρ1 con GFP, no afecta considerablemente sus propiedades funcionales (*Martínez-Torres y Miledi, 2001*), lo que ayudaría posteriormente, a determinar la ruta de transporte, vías de distribución y señalización del receptor GABA_Cρ2 recién traducido desde el complejo ribosomal hasta la membrana plasmática.

V. JUSTIFICACIÓN

La distribución celular de los receptores GABA_C está en continuo estudio, hasta el momento la distribución tisular, localización celular y el significado funcional y/o fisiológico de los receptores GABA_C no se ha esclarecido por completo.

Este trabajo, tiene la finalidad de construir y caracterizar la fusión GABA bp2-GFP. Utilizando para ello, la combinación de técnicas moleculares para la generación de la proteína quimérica y electrofisiológicas para el estudio del receptor GABA bp2-GFP en células en cultivo.

De esta manera, se determinaría si la fusión es funcional para posteriormente realizar investigaciones acerca de la dinámica intracelular y la posible visualización de vías de participación en procesos fisiológicos o patológicos que involucran a los receptores GABA_C.

VI. HIPÓTESIS

La quimera GABA bp2-GFP expresará receptores funcionales y su inserción en la membrana plasmática de células HEK 293, HuTu 80, ovocitos de *X. laevis* y cultivos primarios de cerebelo de rata permitirá su visualización por microscopía de fluorescencia

VII. OBJETIVOS

Objetivo General.

- Caracterizar funcionalmente la fusión GABA bp2-GFP y observar su distribución en células de mamífero en cultivo y ovocitos de *Xenopus laevis*

Objetivos Particulares.

- Construcción de la fusión GABA bp2-GFP.
- Caracterización molecular de la fusión GABA bp2-GFP.
- Caracterización funcional del receptor quimérico GABA bp2-GFP en ovocitos de *X. laevis*
- Observación de la distribución del receptor quimérico en ovocitos de *X. laevis* y células en cultivo.

VIII. PERSPECTIVAS

En general, la vía y los mecanismos celulares y moleculares que subyacen al tráfico de neuroreceptores desde y hacia la membrana plasmática en neuronas han sido muy poco estudiados.

Hasta el momento, los estudios sugieren que la compleja red intracelular formada por el citoesqueleto y microtúbulos está implicada en el traslado y correcto anclaje de receptores en la superficie celular. Sin embargo, a pesar de que algunos dominios y señales moleculares han sido identificados en algunos receptores, estas señales no han sido estudiadas en receptores GABA_C. Por lo que con los resultados obtenidos, estos receptores fluorescentes podrían ser utilizados para seguir la dinámica de su movimiento y estudiar cómo otros elementos estructurales (citoesqueleto y microtúbulos), están involucrados en su distribución. Lo cual, no sólo podría contribuir al estudio de canales iónicos y receptores en general, sino a un posible desciframiento de los mecanismos envueltos en la señalización y tráfico de estas proteínas.

Finalmente, será importante determinar la interacción de estas subunidades con las de otras subunidades GABA_C e incluso diferentes receptores, como ya se ha descrito para la subunidad ρ1 y el impacto que esto pudiera tener en el estudio del sistema GABAérgico.

IX. DISEÑO EXPERIMENTAL

- Amplificar el receptor $\rho 2$ de bovino ($b\rho 2$) mediante PCR, remover el codón de terminación de la traducción e introducir un sitio de reconocimiento para la enzima *Bam* H1 al final de la secuencia codificante. (Para la facilitación de las subsecuentes manipulaciones de subclonación).
- Clonar $b\rho 2$ en el vector pGEMT-Easy.
- Una vez lograda la obtención de la clona, proceder a su secuenciación para corroborar su identidad.
- Subclonar GABA $b\rho 2$ en el vector pEGFP-N2, el cual contiene la proteína verde fluorescente (GFP).
- Inyectar en ovocitos de *X. laevis* las clonas GABA $b\rho 2$ GFP.
- A partir de los ovocitos inyectados con la construcción quimérica GABA $b\rho 2$ GFP caracterizar sus propiedades funcionales, por la técnica electrofisiológica de control de voltaje (“voltaje-clamp”) con dos microelectrodos.
- Transfectar cultivos de las líneas celulares HEK 293 (células de riñón humano) y HuTu 80 (células de duodeno de humano) con la quimera GABA $b\rho 2$ GFP
- Determinar la expresión y distribución del receptor quimérico por microscopía de epifluorescencia en células HEK 293 y HuTu 80
- Llevar a cabo la transfección de la quimera GABA $b\rho 2$ -GFP en cultivos primarios de cerebelo de rata.
- Determinar la expresión y distribución del receptor quimérico por microscopía de epifluorescencia en cultivos primarios de neuronas de cerebelo.

X. MATERIAL Y MÉTODOS

Transformación de *E. coli* con los plásmidos portadores de ADN recombinante de bp2 y pEGFP-N2. Esta técnica se aplicó para la propagación de los plásmidos recombinantes que acarrean: a) el ADNc de bp2 (López-Chávez *et al.*, 2005) y b) pEGFP-N2 (CLONTECH), el cual acarrea el ADNc de la GFP bajo el control transcripcional del promotor del citomegalovirus (CMV).

Para el ensayo se realizó una transformación por choque térmico en *E. coli* (cepa DH5 α) (Sambrook *et al.*, 2001). Se adicionaron 4 μ l (1 ng/ μ l) de ADN plasmídico a un tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 50 μ l de células *E. coli* competentes (DH5 α) y se incubaron 20 min en hielo, después se dio el choque térmico a 42°C por 45 seg, se incubó en hielo por 2 min. A continuación se añadieron 950 μ l de medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levaduras 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0) y se incubó a 37°C por 90 min. Se sembraron 200 μ l de las células en caja Petri que contenía medio LB-Agar con ampicilina (50 μ g/ml) o kanamicina (10 μ g/ml) para pEGFP-N2. Se incubó hasta el día siguiente a 37°C. Se levantaron las colonias individuales para ser inoculadas en tubos de cultivo, conteniendo medio LB más ampicilina ó kanamicina, se incubó toda la noche a 37°C en agitación y se procedió a hacer la extracción del ADN plasmídico.

Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina. Se centrifugaron 1.5 ml del medio LB que se dejó incubando la noche anterior por 2 min a 17530 g (centrífuga Beckman, rotor F2415), la pastilla se resuspendió en 100 μ l de la solución I que contiene (Tris-Cl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0). Se agitó vigorosamente en el vortex hasta que la pastilla se disolvió completamente, y se incubó 5 min en hielo. Se adicionaron 200 μ l de la solución II que contiene (0.2 ml de NaOH 10 N, 1.0 ml de SDS 10% y 8.8 ml de agua), se mezcló por inversión, se incubó 5 min en hielo. A continuación se agregaron 150 μ l de la solución III que contiene (60 ml de acetato de

potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético concentrado, 28.5 ml de agua), se agitó en el vortex y se incubó 5 min en hielo. El tubo se centrifugó 5 min a 17530 g, el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, se agregó un volumen igual de fenol saturado y un volumen de cloroformo, se mezcló en el vortex 5 min y se centrifugó 15 min a 17530 g; el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 2 volúmenes de etanol al 100% dejándose incubar 1 hora a -70°C, se repitió el paso de centrifugación y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con etanol frío al 70% y después de centrifugar a 17530 g, se removió completamente el sobrenadante dejando escurrir la pastilla; ésta fue resuspendida en 50 µl de H₂O. El material aislado fue analizado en un gel de agarosa al 0.8%, corriendo a 90 V por 30 min.

Mutagénesis sitio dirigida por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente y mediante el uso de los cebadores BRHO2-5´(atgccttattttacaagactcatttg) y BR25EBAM-3´ (ggatcccggaaaacactgaccaataaat), se amplificó la región que codifica para receptor b_ρ2 removiéndose el codón de paro de la traducción y se introdujo un sitio para *Bam* H1 al final de la secuencia de codificación, (para facilitar las subsecuentes manipulaciones de subclonación). El protocolo de la PCR se llevó a cabo a 94 °C (30 s), 56 °C (30 s), y 72 °C (90 s) por 30 ciclos. Con una amplificación final de 5 min a 72 °C. Las condiciones de la reacción de PCR se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Componentes	Volumen /50µl
Buffer 10 X	5 µl
dNTP's (10mM)	1 µl
MgCl ₂ (50mM)	3.5 µl
Primer 5´ (2.5 µM)	4 µl
Primer 3´ (2.5 µM)	4 µl
Taq poli (5 U/µl)	1 µl
cADN _ρ 2 (1ng/nl)	3 µl
H ₂ O	28.5 µl

El producto obtenido de la amplificación fue analizado en un gel de agarosa al 0.8% y posteriormente purificado mediante el protocolo del estuche de extracción de ADN a partir de geles de agarosa de la marca QIAGEN.

Purificación. Una vez identificado el producto de PCR en un gel de agarosa se procedió a cortar las bandas de interés, detectadas con luz UV. Las bandas seleccionadas se colocaron en tubos Eppendorf para obtener el peso de la agarosa que contenía las bandas de interés. Se agregaron 3 volúmenes de solución QG (Tris-Cl 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, pH 8.0) y se incubaron por 10 min a 50°C hasta que la agarosa se disolvió (agitando al vortex), se agregó un volumen de isopropanol a cada muestra y se mezcló. La solución se transfirió a una columna de sílica que sirve de matriz de afinidad para el ADN y se centrifugó 1 min a 9000 g. Se descargó el precipitado (filtrado de la sílica) y se agregó 0.5 ml de solución QG (0.2 ml de NaOH 10 N, 1.0 ml de SDS 10% y 8.8 ml de agua), a la columna para después centrifugar 1 min a 9000 g. Posteriormente se descargó el precipitado y se agregó a la columna 0.75 ml de buffer PE que contiene: (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético concentrado, 28.5 ml de agua), se centrifugó 2 min a 8944 g. Después se colocó la columna en un tubo limpio, añadiendo 30 µl de agua y centrifugando 1 min a 8944 g.

Ligación. La ADN ligasa, enzima que tiene la capacidad de formar enlaces fosfodiéster en una cadena de ADN rota, puede unir covalentemente ADNs de diferentes orígenes para formar moléculas híbridas. El fragmento obtenido de la PCR se preparó para el ensayo de ligación en el vector pGEM-T Easy (PROMEGA), como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Buffer 5X	5 µl
p-GEMT easy vector (50ng/µ)	1 µl
PCR (producto)	3 µl
T4 ADN ligasa (5 U/µl)	1 µl

La ligación se llevó al cabo por 1 h a temperatura ambiente y el producto se analizó en un gel de agarosa al 0.8% con corrimiento en una fuente de poder a 90 V por 30 min, para posteriormente colocar 5 µl de cada ligación en un tubo eppendorf de 1.5 ml y dejarlo en hielo por 20 min. Se descongelaron células competentes *E. coli* (DH5α), y se procedió al protocolo de transformación (descrito anteriormente). Después de la incubación por 1.5 h a 37°C, se sembraron 200 µl de las células en una placa que contenía medio LB con ampicilina (50 µg/ml) + 20 µl IPTG (0.1 M) + 50 µl X-GAL (20 mg/ml). Se dejó incubando (14-16 h), a 37°C. Se levantaron las colonias blancas (las cuales al tener inserto el gen de interés bp2 no permiten que se exprese el gen reportero *lac z* para producir el color azul), las cuales fueron inoculadas en tubos conteniendo medio LB más ampicilina (50 µg/ml); se continuó con la incubación en agitación toda la noche a 37°C, después de lo cual se procedió a hacer la extracción de ADN plasmídico. Se levantó una colonia azul como control negativo.

Clones obtenidos. Un importante paso en el proceso de clonación es la identificación del clon o clones que contienen el ADN recombinante. Para identificar éstos transformantes se emplean varios métodos, uno de ellos es la caracterización enzimática y secuenciación.

Caracterización enzimática. Esta técnica se basa en el principio de la enzimología de restricción donde de una molécula de ADN dada se obtendrán siempre los mismos fragmentos cada vez que sea expuesta a una enzima de

restricción particular. Se aisló el ADN plasmídico, se realizó su caracterización por medio de los dos sitios de corte *EcoR I* y *BamH I*, que flanquean el inserto (la reacción de digestión se muestra en la Tabla 3). Se incubó a 37 °C por 1 h y el producto se analizó en electroforesis en gel de agarosa 0.8%.

Tabla 3

ADN plasmídico	2 µl
<i>EcoR I</i> (10 U/µl)	1 µl
<i>BamH I</i> (10 U/µl)	1 µl
Buffer 3 (Invitrogen)	1 µl
H ₂ O	5 µl

Subclonación en el vector pEGFP-N2. Se obtuvo el ADN plasmídico de los plásmidos pEGFP-N2 (Clontech) y pGEMT-bp2 (ΔStop *BH1*), en cultivos de bacterias a mediana escala (50 ml en LB)(*Sambrook et al, 2001*).

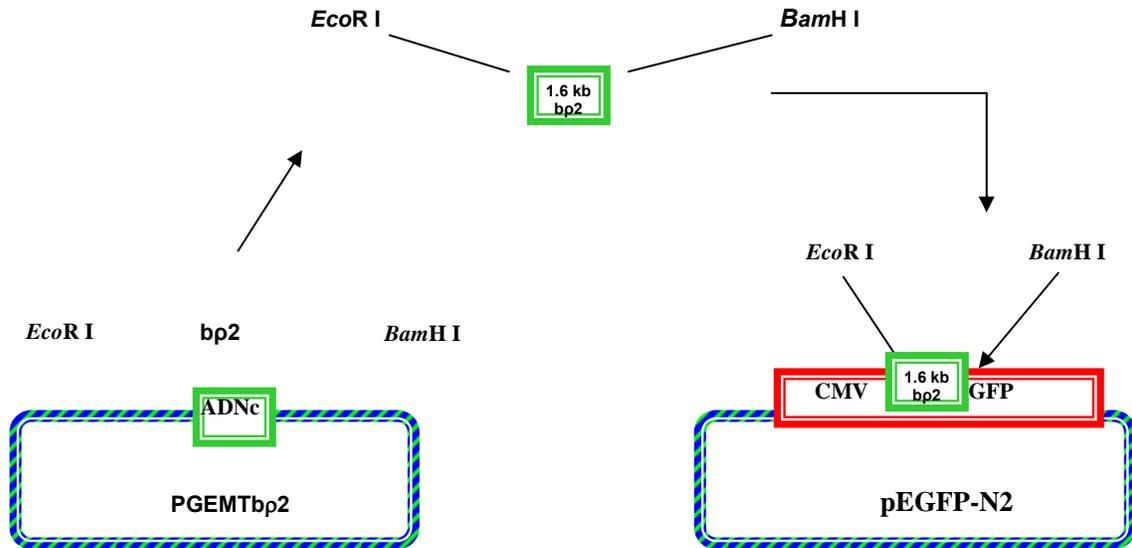


Figura 5. Estrategia de clonación del inserto (*bp2*) en el vector pGEMT y subclonación en el vector pEGFP-N2. MCS, sitio de clonación múltiple.

Para liberar el inserto correspondiente al ADNc de ρ2 (ya modificado en su extremo 3'), del vector pGEMT-Easy y unir este inserto al vector pEGFP-N2 se usaron los sitios de restricción afines a ambos vectores y que permitieron una clonación directa de tal manera que se conservara la fase de lectura. Las condiciones de reacción de corte para liberar ρ2 de pGEMT y para la preparación del vector pEGFP-N2 se muestran en las Tablas 4 y 5. El esquema de liberación del inserto y su inserción en el vector pEGFP-N2 se muestra en la Figura 5.

Tabla 4

Liberación del inserto ρ2- pGEMT

Buffer 3 (Invitrogen)	2 µl
<i>EcoR</i> I (10 U/µl)	1.5 µl
<i>BamH</i> I (10 U/µl)	1.5 µl
ADN (1.5 µg/µl)	10 µl
H ₂ O	5 µl

Tabla 5

Digestión del vector pEGFP-N2

Buffer 3 (Invitrogen)	3.2 µl
<i>EcoR</i> I (10 U/µl)	1.5 µl
<i>BamH</i> I (10 U/µl)	1.5 µl
ADN (1.5 µg/µl)	10 µl
H ₂ O	5 µl

La digestión se dejó toda la noche a 37 °C y el producto de la digestión se observó en un gel de agarosa al 0.8 % y las bandas de interés fueron purificadas, como se describió anteriormente.

Ligación. Se procedió a ligar el inserto ρ2 (*EcoR* I-*BamH* I al vector pEGFP-N2 (*EcoR* I-*BamH* I), usando las condiciones de reacción de ligación que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Buffer de ligación 5x (Invitrogen)	3 µl
pEGFP-N2 (<i>EcoR</i> I- <i>BamH</i> I)	4 µl
cADNρ2 (Stop BH1)	7 µl
T4 ADN Ligasa (5 U/µl)	1 µl

Se incubó toda la noche a temperatura ambiente. El producto de la ligación se transformó en células competentes *E. coli* (cepa DH5 α) se extrajo el ADN plasmídico y la clona se identificó mediante la digestión con las enzimas *EcoR* I-*BamH* I para liberar el inserto predicho que corresponde al ADNc de bp2.

Secuenciación. Se realizó una secuenciación para corroborar la identidad de nuestro producto por medio del Secuenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), siguiendo las especificaciones del estuche Big Dye sequencing V.2 y utilizando los terminadores ddNTP's marcados con el fluorocromo IRDye-800. (Unidad de Biología Molecular INB-UNAM), analizando su identidad mediante el programa BLAST.

Expresión de p2-GFP en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los ovocitos de *X. laevis* son utilizados para la caracterización funcional de canales iónicos y neuroreceptores, debido a las pocas conductancias iónicas endógenas que posee. De esta manera, se puede expresar el receptor de interés y evaluar su comportamiento eléctrico, además de ser una herramienta fácil de manipular, accesible y bastante resistente al daño mecánico. Los ovocitos son células inmaduras cuyo ciclo celular está interrumpido en la profase meiótica 1. Se dividen en 6 estadios. En estado maduro miden entre 1 y 1.5 mm de diámetro (estadio V-VI) y están divididos por una línea ecuatorial en dos hemisferios: el hemisferio vegetal (color claro) y el hemisferio animal (oscuro) donde se localiza el núcleo o vesícula germinal, Figura 6.

Se utilizaron ranas hembra, las cuales se anestesiaron por hipotermia y se colocaron en decúbito dorsal sobre hielo. Se realizó antisepsia abdominal e hizo una incisión de aproximadamente 1 cm en piel, se procedió a disecar el tejido celular subcutáneo y se realizó un corte de 0.5 cm aproximadamente, en el músculo y peritoneo parietal subyacentes. Enseguida se introdujeron pinzas de disección sin dientes en la cavidad peritoneal y se extrajeron los ovocitos, los cuales fueron

colocados en cajas Petri con medio Barth modificado (pH 7.7, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.82 mM MgSO₄, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.42 mM CaCl₂ y 5 mM de HEPES) que contiene gentamicina (0.1 mg/ml). Una vez extraídos los ovocitos se procedió a cerrar la incisión por capas con catgut 5 ceros para músculo y peritoneo y con prolene 5 ceros para piel.

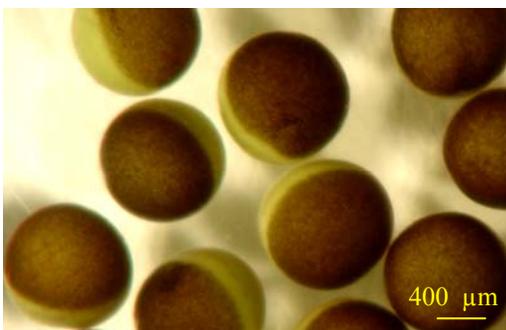


Figura 6. Ovocitos en estadio V-VI, en el que se desarrollaron los ensayos de expresión heteróloga.

Con la finalidad de remover las células foliculares que rodean al ovocito, los folículos se trataron con 0.5 mg/ml de colagenasa (Clostridiopeptidasa tipo I Sigma), disuelta en solución de Ringer (115 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 1.8 mM de CaCl₂ y 5.0 mM de HEPES, pH 7.0) por 40 min. Los ovocitos se aislaron del resto del folículo con pinzas de punta fina y se incubaron a 16°C por 24 h en medio de Barth con gentamicina (0.1 mg/ml).

Expresión heteróloga. Cuando los ovocitos se inyectaron con ARNm o ADNc exógenos (provenientes de otro tejido o tipo celular), la maquinaria transcripcional y traduccional del ovocito los reconoce y sintetiza las proteínas codificadas por éstos. En este caso, el ADNc plasmídico de bp2GFP, inyectado en el ovocito codificó proteínas las cuales al ser insertadas en la membrana del ovocito pueden ser fácilmente estudiadas por métodos electrofisiológicos (*Gundersen et al., 1983; 1984; Sumikawa et al., 1984*).

De esta manera, los ovocitos se inyectaron con la construcción GABA ρ2GFP para su caracterización funcional mediante un microinyector de presión (Nanoject, World Precision Instruments), con agujas limpias y nuevas (Capilares de Borosilicato, Kwik-Fil. World Precision Instruments). Se inyectó 27 nl de la quimera (ρ2-GFP), en el polo animal del ovocito. Del día 1 a 5, post-inyección y con un promedio de sobrevivencia de ovocitos inyectados del 80 %, se realizaron observaciones en el microscopio de epifluorescencia (longitud de onda máxima de excitación 489 y de emisión 508). Posteriormente se realizó el registro de los receptores expresados mediante la técnica de control de voltaje con dos microelectródos, técnica que se ha empleado ya para la caracterización de otros receptores y canales iónicos (*Gundersen et al., 1983, 1984; Miledi et al., 1982*).

Registros Electrofisiológicos. La técnica de control de voltaje con dos microelectródos, fue desarrollada por *Kenneth Cole* en 1949. Esta técnica permite fijar el potencial de membrana a valores predeterminados y fue adaptada al registro de ovocitos por *Miledi, 1982*.

Debido a que los canales activados por voltaje se cierran o abren continuamente en respuesta a cambios en el potencial de membrana, la fijación de voltaje previene los cambios resultantes en las corrientes de membrana provocados por cambios en el potencial. Es por ello que esta técnica permite realizar mediciones del efecto producido por los cambios en el potencial sobre la conductancia a especies iónicas (*Hille, 2001; McCormick, 1999*).

El protocolo de activación para receptores GABA_C en ovocitos previamente inyectados con ρ2GFP fue el siguiente:

Los ovocitos fueron colocados en una cámara de registro (Oocyte Bath Clamp 7251 I Warner Instruments Corporation), la cual estuvo continuamente perfundida en

solución Ringer. Los registros se realizaron a temperatura ambiente (20 a 25 °C) manteniendo una fijación de voltaje a -80 mV (Oocyte Clamp OC-725C, Warner Instruments). Los registros obtenidos (DIGIDATA 1322A, Axon Instruments), fueron grabados y analizados con los programas pCLAMP y Microcal Origin Pro 7 respectivamente.

Expresión en cultivos celulares. Después de la caracterización electrofisiológica y funcional en ovocitos, se realizó la expresión heteróloga, en cultivos celulares para determinar las características funcionales y localización celular de la quimera bp2GFP.

Transfección. Se propagaron las células HEK 293 (células embrionarias de riñón humano) y HuTu 80 (células de duodeno de humano), con el fin de realizar transfecciones transitorias. Esta técnica de transfección, se ha desarrollado principalmente para introducir ADN recombinante en el interior de la célula utilizando principalmente un lípido catiónico (Lipofectamine 2000 Invitrogen). De esta manera, se introdujo GABA bp2GFP (ADN recombinante), en el cual se sitúa la secuencia codificante de un gen reportero (en este caso GFP), bajo una secuencia de regulación transcripcional, promotor “enhancer” del citomegalovirus (CMV).

Se diluyó el ADN (0.8 µg) en 50 µl de medio Opti-MEM (Invitrogen) y se mezcló suavemente. Posteriormente se mezcló la lipofectamina, diluida en medio Opti-MEM, se mezcló e incubó a temperatura ambiente. Después de 5 minutos de incubación se mezcló el ADN y medio con la lipofectamina diluida (volumen total 1000 µl), se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente permitiendo que el complejo ADN-lipofectamina se formara. Se agregó 100 µl de ADN-lipofectamina a cada caja Petri con un cubreobjetos, conteniendo una confluencia de 60% de células se incubó a las células a 37 °C en una incubadora con CO₂ 5%, por 24-48 h para su posterior observación por microscopia de fluorescencia.

Cultivos primarios. Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide (2n), su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto. El estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una actividad y funcionalidad similar a la que tienen en su ambiente natural por lo que se desarrollaron cultivos primarios de neuronas de cerebelo de rata.

Cultivos primarios de neuronas de cerebelo. Para el cultivo celular de las neuronas de Purkínje (*Furuya et al., 1998*), se utilizaron ratas hembra (*Wistar*) con un período de gestación de entre 20-21 días. Se abrió la cavidad peritoneal y extrajeron los cuernos uterinos. Estos, fueron transferidos a una placa de cultivo conteniendo PBS (solución de fostato salino pH 7.4). Los embriones fueron transferidos a una segunda placa de cultivo la cual contenía medio de disección (medio de Hanks BBS libre de Ca⁺⁺/Mg⁺⁺, GIBCO). Se obtuvieron los cerebros enteros de los embriones y fueron transferidos a un tubo Falcon estéril con 35 ml medio de disección (*Furuya et al., 1998*). Los cerebelos fueron disectados y posteriormente se removieron las meninges. Después de la disección de cerebelos, se transfirieron a medio de disección frío, lavándolos por centrifugación a 9000 g (centrífuga Beckman, rotor C0650), por 2 minutos. La operación se repitió en 10 ml de medio fresco de disección. Se agregó al tubo 2 ml de tripsina 0.1% diluida con medio de disección e incubó por 10 minutos a 37°C en un baño de agua termo-controlado. Después de la incubación, se agregó 10 ml de medio de disección al tubo y centrifugó a 9000 g por 3 minutos. Se removió el sobrenadante por aspiración y se repitió la operación. Se adicionó 1 ml de solución de ADNasa (0.05%, Boehringer Mannheim) al tubo y disociaron los cerebelos al tratar con tripsina y homogenización con una pipeta Pasteur. Después de disociados, se agregó 10 ml de medio de disección al tubo y se centrifugó a 184 g por 5 minutos (centrífuga Beckman, rotor C0650). Se resuspendió el paquete celular formado en 1-1.5 ml de medio de cultivo selectivo (DMEM /F-12,

GIBCO) para lavar este paquete de las posibles células no-neuronales tales como fibroblastos y células gliales. Se sembró la suspensión en cajas de cultivo cubiertas con poli-L-ornitina 10 µg/ml e incubó 20 minutos en una incubadora (37°C, 5% CO₂). Después de la incubación, se recuperó la suspensión celular, se contó el número de células y diluyó la suspensión celular a una densidad de 5 X 10⁶ células/ml.

La suspensión de células se sembró en placas de cultivo, incubando 4 h (37°C, 5% CO₂). Se añadió 0.4 ml de DMEM/F-12 sin suero que contenía el suplemento N3 (Progesterona 4 mM, insulina de bovino 2 mg/ml y transferrina 20 mg/ml) y T3 (triyodotironina, 0.5 ng/ml) a cada pozo de la placa de cultivo.

Al ser establecidas las condiciones, los cultivos se lavaron en DMEM/F-12 sin suero y agregó posteriormente DMEM/F-12 que también contenía los suplementos N3,T3 y albúmina de suero bovino (100 µg/ml). Esto resultó en un medio que contenía aproximadamente 1% de suero fetal bovino. En el transcurso del cultivo, se substituyó la mitad del medio por DMEM/F-12 (sin suero), el cual contenía el suplemento N2 y conteniendo además, AraC (arabinósido de citosina, 4 µM) los días 9 y 16 post-cultivo.

Extracción de ARN total. Con el propósito de identificar el ARNm codificante para ρ2 en los cultivos primarios de cerebelo y en el mismo tejido, se aisló ARN total de cerebelo de rata Wistar (de los días 0, 1, 3, 9, 16, 21, 23 de días de nacimiento). (*Chomczynski y Sacchi, 1986; Sambrook et al., 2001*). Se pesaron los cerebelos y colocaron en tubos de 50 ml. Se agregó 1 ml de solución D (isotiocianato de guanidina 0.15 M, agua DEPC (ver apéndice A); citrato de Na 0.75 M y sarcosil 10% pH 7) por cada 100 mg de tejido. Inmediatamente, se homogenizó la mezcla con el sonicador Ultraturrax T25. En seguida se agregó al homogenizado 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 se agitó vigorosamente por 10 segundos y colocó

en hielo por 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 9000 g por 20 min a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se mezcló con 1 ml de isopropanol y colocó a 20°C por 1 h. Posteriormente se centrifugó a 8944 g por 20 minutos. El paquete de ARN resultante se disolvió en 0.3 ml de solución D y precipitó con un volumen de isopropanol a -20°C por 1 h. Después de volver a centrifugar la muestra a 8944 g por 10 minutos a 4°C, el paquete resultante fue resuspendido en etanol al 75%, sedimentado por centrifugación y secado al vacío. El ARN total resultante fue resuspendido en agua tratada con DEPC, 50 µl por cada 100 mg de tejido procesado.

Finalmente, dado que el primer paso de aislamiento de ARN involucra provocar lisis en la célula dentro de un ambiente químico que desnaturaliza las ribonucleasas, una forma de comprobar que se realizó la extracción de ARN total es la electroforesis en gel de agarosa. Se determinó el rendimiento y la concentración de éste, por medio de espectrofotometría y corrimiento en un gel de agarosa al 0.8% (ver apartado de resultados).

RT-PCR. Se utilizó RT-PCR (obtención de ADN complementario y su posterior amplificación selectiva mediante la reacción en cadena de la polimerasa), como ensayo para determinar si en el cerebelo de rata se encuentra el ARN que codifica la subunidad ρ2 de los receptores GABA_C. Para efectuar la RT-PCR en un tubo de reacción, se mezcló el ARN obtenido de cerebelo con los iniciadores ρ2 5' cagtacaaaatcgagagagtttg y ρ2 3' gtgtacatagtaaagccaataaac y con reactivos necesarios para la retrotranscripción y PCR, para obtener finalmente el fragmento correspondiente a ρ2.

El protocolo de la PCR se llevó a cabo a 94 °C (30 s), 56 °C (30 s), y 72 °C (90 s) por 35 ciclos. Con una amplificación final de 5 min a 72 °C. Las condiciones de la reacción de PCR se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Componentes	Volumen /50µl
Buffer 10 X	5 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3.5 µl
Primer 5' (2.5 µM)	3 µl
Primer 3' (2.5 µM)	3 µl
Taq poli (5 U/µl)	1 µl
ADN _α 2 (1 ng/nl)	3 µl
H ₂ O	30.5 µl

Inmunohistoquímica (IHQ). Esta técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a sus antígenos correspondientes. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo secundario está conjugado con una sustancia que absorbe y/o emite luz (fluorescencia) o produce coloración (como la peroxidasa) al ser expuesta al sustrato correspondiente.

Para la verificación de identidad neuronal de los cultivos primarios de cerebelo se realizó una inmunodetección (*Martínez-Delgado, 2002*), de la proteína calbindina, en cortes e tejido de cerebelo. Así como una IHQ anti GFP, para verificar la transfección GABA bp2GFP en los cultivos celulares.

Las células en cultivo se lavaron con solución de fosfatos (PBS), se fijaron en metanol absoluto a -20 °C por 8 min. Posteriormente, para eliminar residuos del fijador se lavaron con PBS, se incubaron con suero fetal bovino para eliminar la posibilidad de uniones inespecíficas. Se incubó con el primer anticuerpo (conejo anti-GFP a una dilución 1:50), en una cámara húmeda por 16-18 h a 4 °C. Después de la incubación se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-conejo marcado con rodamina, dilución 1:50). Se montó con glicerol al 70% y observó por emisión de luz ultravioleta a una de onda máxima de excitación 489 nm y 508 nm de emisión.

XI. RESULTADOS

Generación de la quimera ρ2-GFP. Mediante el uso de los “primers” BRHO2-5´ y BR25EBAM-3´, se amplificó el ADNc de bp2 removiéndose el codón de terminación de la traducción e insertando un sitio de corte *Bam* H1 después de la secuencia codificante. En la Figura 7a, se observa el producto de PCR obtenido. Este se purificó y secuenció. Se clonó en el vector pGEM-T Easy para facilitar su subclonación. La Figura 7b, muestra la caracterización enzimática de la clonación de bp2 en el vector de clonación pGEM-T Easy.

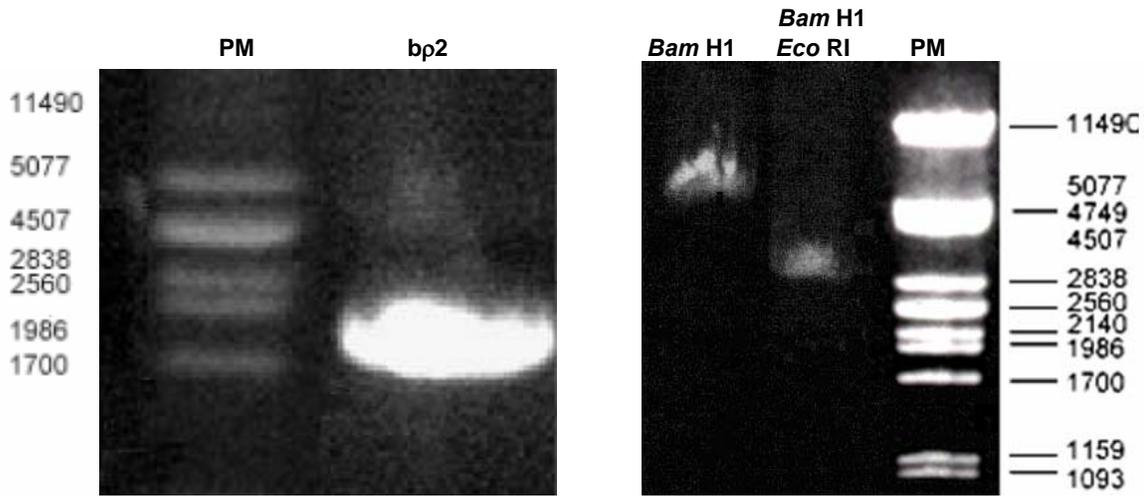


Figura 7. Construcción de receptores quiméricos por PCR recombinante. a) Electroforesis en gel de agarosa para el ADNc de bp2 (1628 pb). El primer carril corresponde al marcador de peso molecular (PM). b) Electroforesis en gel de agarosa para el ADN plasmídico de pGEMT- easy (3 Kb) más la liberación del inserto bp2 (1.6 Kb) con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI.

La Figura 8 muestra la secuencia parcial de la fusión ρ2-GFP. Este producto se secuenció y realizó una caracterización enzimática (Figura 9a). El mapa funcional y de restricción del plásmido pEGFPN2-bp2, el cual contiene el ADNc de GFP

fusionado al 3' terminal de bp2 bajo el control transcripcional del promotor de CMV se muestra en la Figura 9b.

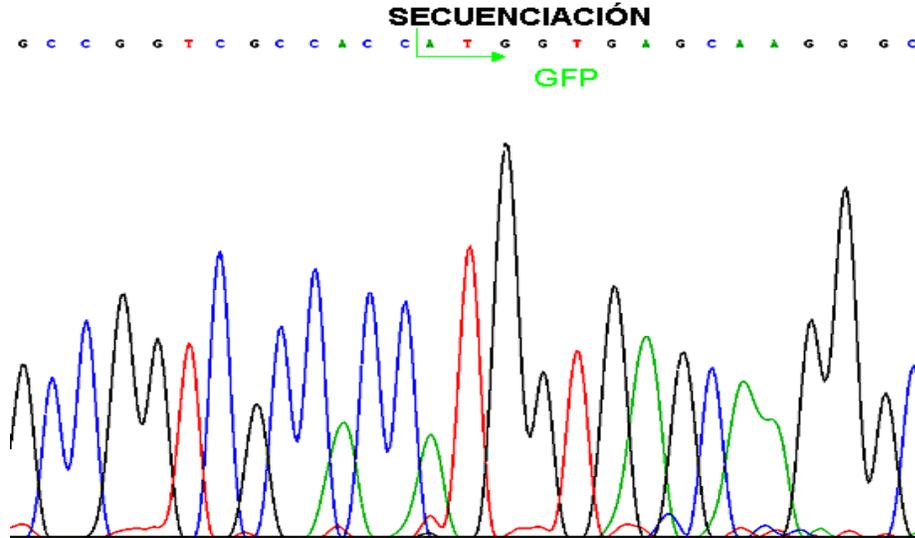


Figura 8. Electroforetograma de secuenciación, que muestra la región de la fusión de p2 con GFP en el vector pEGFP-N2.

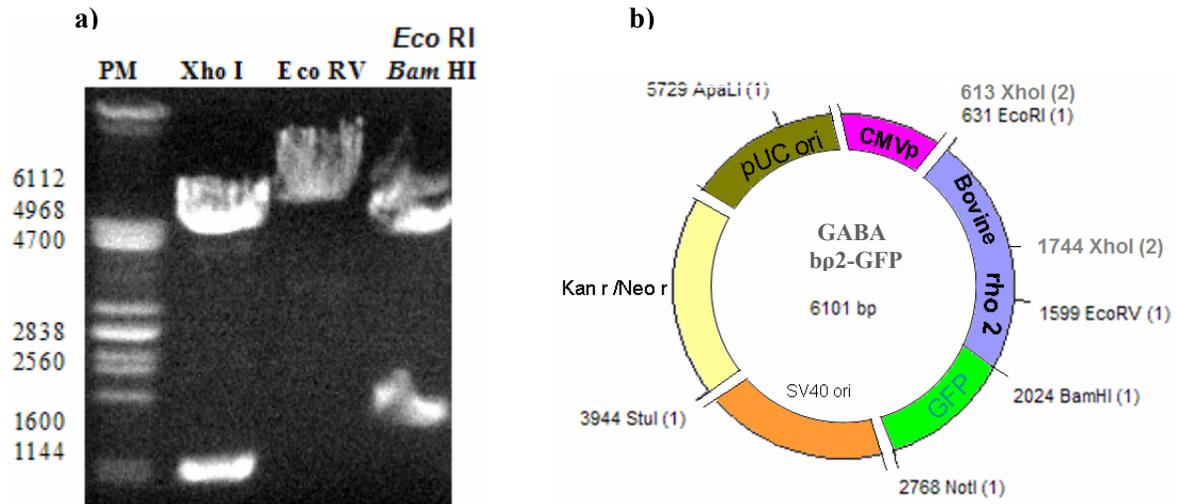


Figura 9. a) Caracterización enzimática y b) mapa de restricción funcional de pEGFPN2-GABA bp2, donde se observa la inserción del pásmido bp2 el sitio molecular de clonación con las enzimas EcoR I y BamH I.

Expresión de la fusión del receptor quimérico bp2GFP en ovocitos. Se procedió a verificar si este gen quimérico es funcional. Para lo cual se llevaron al cabo observaciones por microscopía confocal con fluorescencia y posteriormente electrofisiológicas en ovocitos de *X. laevis* inyectados con bp2GFP. La Figura 10 muestra una serie de ovocitos observados al microscopio confocal con una excitación de 480 nm y emisión de 530 nm. En esta serie de imágenes, se logró ver claramente la localización de la fluorescencia hacia la periferia del ovocito.

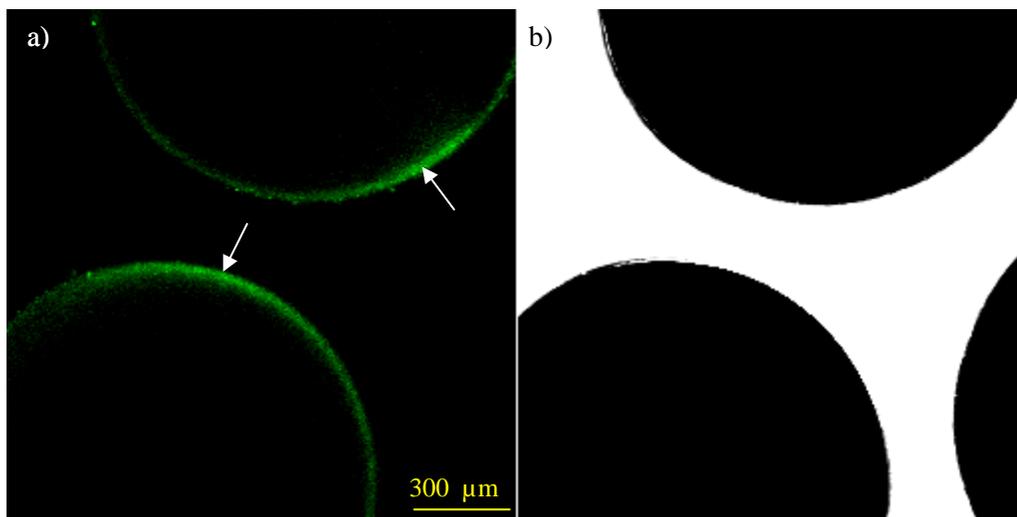


Figura 10. Expresión funcional de receptores ρ2 fusionados a GFP. a) Imagen por microscopía confocal de fluorescencia de ovocitos de rana expresando ρ2-GFP a las 72 h post-inyección. Nótese la distribución preferente hacia el hemisferio animal, indicado por la flecha. b) Ovocitos control, sin inyectar.

La Figura 11 muestra una serie de ovocitos observados al microscopio confocal en serie de “z scan” con una longitud de onda de excitación de 480 nm y emisión de 530 nm.

Nuestros estudios mostraron (n=100) que el receptor GABA ρ2 fusionado genéticamente con la proteína verde fluorescente (GFP), es transportado hacia la periferia del ovocito y preferencialmente hacia el hemisferio animal. Datos que

concuerdan con los obtenidos en estudios realizados con la subunidad ρ1 fusionada con GFP (*Martínez-Torres y Miledi, 2001*).

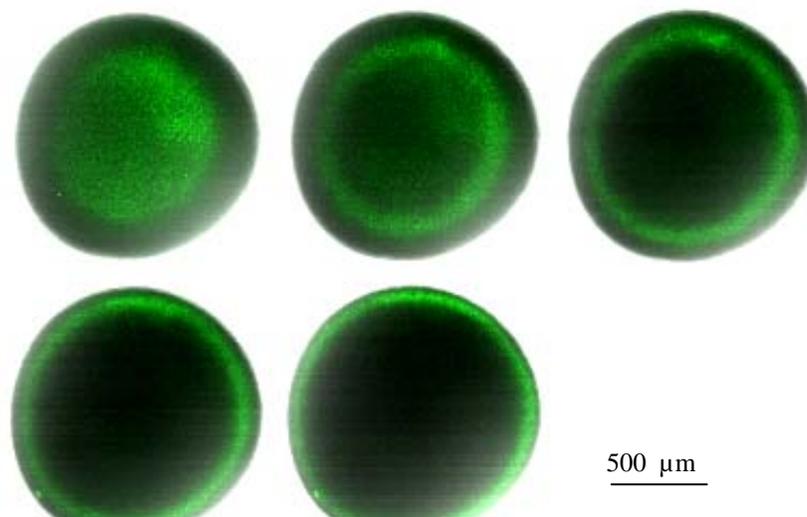


Figura 11. Serie de imágenes barrido en "z scan". La expresión funcional de receptores ρ2 fusionados a GFP de ovocito de rana 72 h después de la microinyección.

Electrofisiología. 72 h post-inyección, se realizaron registros de los ovocitos expresando los receptores, mediante la técnica de control de voltaje con dos microelectrodos. Cabe mencionar que mediante la expresión de la subunidad ρ2 en ovocitos, en un trabajo previo se comprobó que esta subunidad forma receptores funcionales. Lo cual indica que es posible la formación de receptores GABA_C ρ2 homoméricos (*López-Chávez et al., 2005*). Las corrientes generadas por la quimera GABA ρ2GFP y por GABA ρ2 (silvestre), tuvieron una amplitud de corriente máxima de aproximadamente 700 nA, que se activa (100 μM de GABA), lentamente y se desensibiliza muy lento como se muestra en la Figura 12 para ρ2GFP. Estos resultados sugieren que la fusión de receptores ionotrópicos con GFP, no afecta sus propiedades funcionales considerablemente.

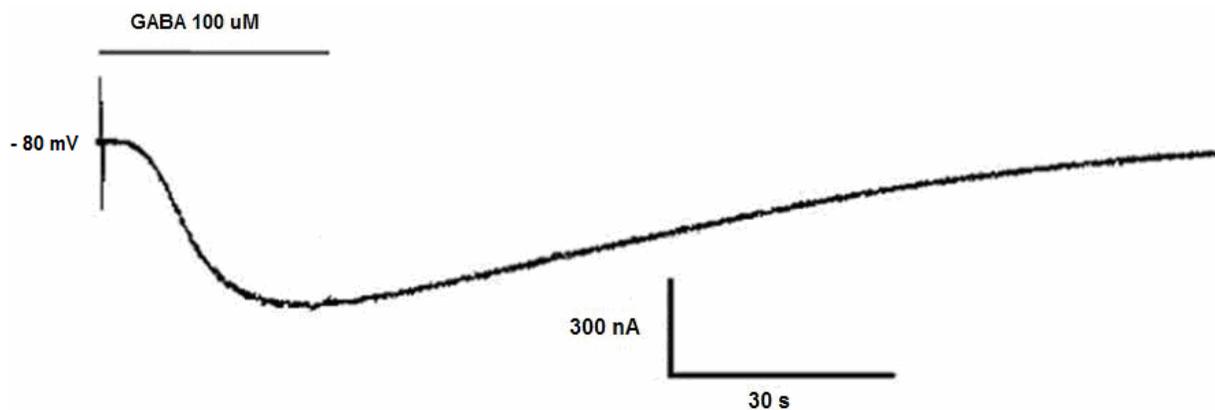


Figura 12. Expresión funcional de GABA ρ 2GFP en ovocitos de *X. laevis*. Corriente generada por GABA 100 μ M.

Al igual que ρ 1 y ρ 2, la fusión GABA ρ 2GFP es sensible a TPMPA. La Figura 13 muestra la corriente generada por GABA y su subsiguiente antagonismo por TPMPA.

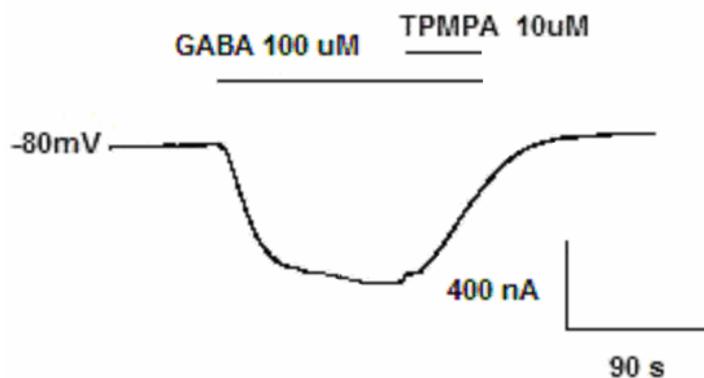


Figura 13. Caracterización funcional de GABA ρ 2GFP en ovocitos de *X. laevis*. Corriente generada por GABA 100 μ M y posterior efecto antagonístico de TPMPA.

Simultáneamente con los registros electrofisiológicos del receptor quimérico (GABA bp2GFP) y una vez comprobada la funcionalidad del receptor quimérico, nos interesó evaluar la localización de la subunidad ρ2 en los ovocitos. Por lo que se realizaron cortes de ovocitos expresando la quimera bp2GFP, embebidos en Tissue-Freezing (Leica Instruments). En el primer día después de la inyección no se observó fluorescencia y no fue sino hasta las 72 horas post-inyección en que se observó la expresión de la quimera bp2GFP. Así mismo, el análisis de intensidad de fluorescencia, determinó que ésta se encuentra presumiblemente en la membrana plasmática del ovocito como se muestra en la Figura 14 (a, b).

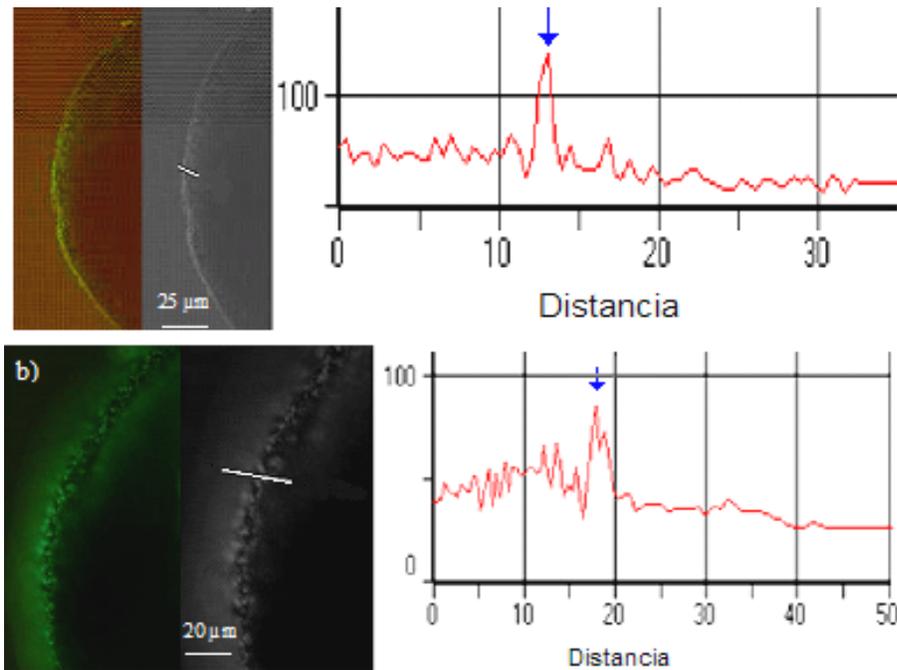


Figura 14. Intensidad de fluorescencia emitida por ρ2GFP en el ovocito de *X. laevis*. Como se logra observar por la flecha, la línea que marca la mayor intensidad de fluorescencia obtenida se obtiene en la tangente con la membrana plasmática del ovocito (flecha). X=distancia en micras, y= unidades relativas de fluorescencia

Transfección células HEK. La Figura 15, muestra por microscopía de fluorescencia las células a las 24 h, después de 48 h post-transfección. Después de varios ensayos (n=25) y después de hacer seguimiento a los mismos, se determinó que la mayor expresión en la transfección de la quimera en células HEK, se obtiene en el período de 24-48 horas, postransfección. En la Figura 15 (a), se observa una fluorescencia intensa de bp2-GFP que aparece principalmente expresado en la región perinuclear, en contraste con la expresión de GFP que se encuentra en toda la célula Figura 15 (b). Este resultado nos hizo plantear que la fusión probablemente no llega a la membrana plasmática, por lo que se realizaron inmunohistoquímicas (IHQ) en células sin permeabilizar, para determinar la localización de GFP, en células HEK transfectadas con la quimera bp2GFP y células HEK transfectadas sólo con GFP Figura 16 y Figura 17 respectivamente.

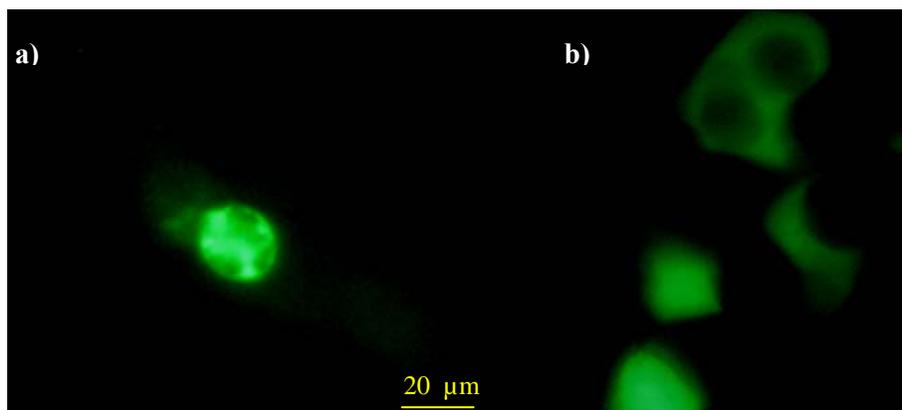


Figura 15. a) imagen por microscopía de fluorescencia de células HEK transfectadas, expresando el receptor quimérico bp2-GFP. 100x b) células HEK transfectadas expresando solo proteína verde fluorescente como control positivo.

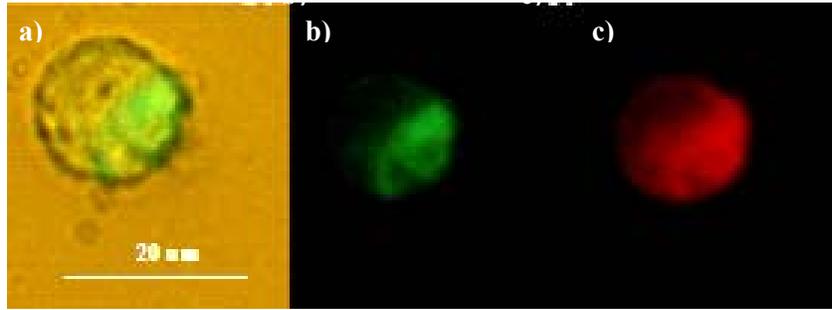


Figura 16. Inmunohistoquímica para la detección de la proteína p2GFP en células sin permeabilizar. El anticuerpo secundario utilizado para la visualización de p2GFP, estaba conjugado con rodamina. A) luz blanca, b) detección p2GFP con filtro U.V y c) detección anti p2GFP con anticuerpo conjugado con rodamina.

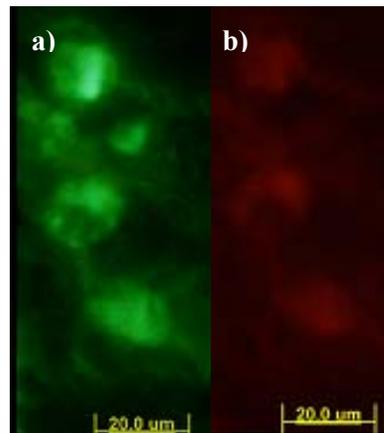


Figura 17. Ensayo inmunohistoquímico sin permeabilización, para la detección de la proteína GFP en células HEK. a) anticuerpo secundario utilizado para la visualización de GFP, conjugado con rodamina b) células transfectadas con GFP visualizadas por U.V.

Con los resultados obtenidos y con el antecedente de una interacción de la proteína MAP-1B con la segunda asa intracelular de p1 la cual pudiera estar ayudando o facilitando el anclaje del receptor a la membrana plasmática (*Hanley et al., 1999; Pattnaik et al 2000*), se procedió a hacer co-transfecciones de la subunidad bp1 con la quimera bp2GFP. De esta manera, estudiamos la distribución subcelular del receptor heteromérico bp2GFP-bp1 y p1GFP-bp2 a las 36 horas y comparamos

su distribución con el receptor homomérico ρ2GFP por microscopía de epifluorescencia (Figura 18). Los resultados mostraron una distribución similar para los casos de cotransfección ρ2GFP-ρ1 y ρ1GFP-ρ2 como se observa en la Figura 18.

Posteriormente y con el afán de contrastar los resultados de la distribución preferencial en los cultivos primarios de neuronas con los obtenidos en líneas celulares no polarizadas (HEK 293), se realizaron ensayos de transfección en células HuTu, línea celular epitelial. Los resultados se muestran en la Figura 19.

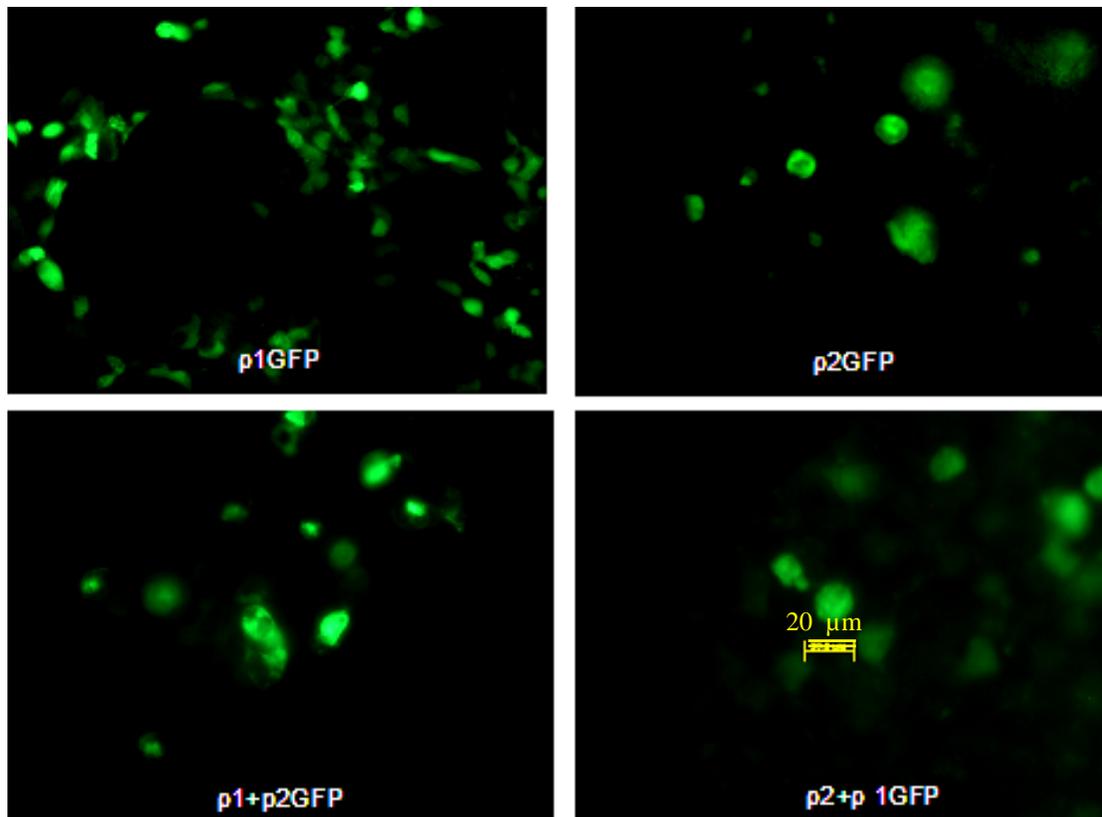


Figura 18. Co-expresión de GABA $\rho2GFP$ - $\rho1$ y $\rho1GFP$ - $\rho2$ en células HEK 293. Estos cultivos fueron co-transfectados con el plásmido de expresión que codifica para los receptores $\rho2GFP$, $\rho1GFP$, $\rho1$ y $\rho2$. La imagen por microscopía de epifluorescencia muestra una distribución similar para la transfección con $\rho2GFP$ con las co-transfecciones $\rho2GFP$ - $\rho1$ y $\rho1GFP$ - $\rho2$.

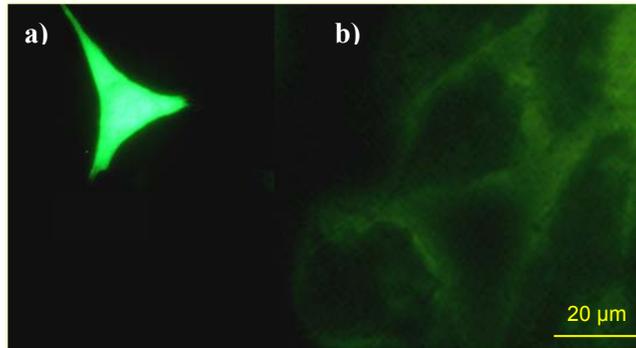


Figura 19. Expresión de GABA $b\rho 2GFP$ en células HuTu. Estos cultivos fueron transfectados con el plásmido de expresión que codifica el receptor quimérico $b\rho 2GFP$. La imagen por microscopia de epifluorescencia muestra a) distribución homogénea para GFP b) $b\rho 2GFP$ está localizada presumiblemente en la membrana plasmática.

Como puede observarse, la fluorescencia en las células HuTu transfectadas con la quimera $b\rho 2GFP$ diverge de las células transfectadas con GFP.

Con respecto a los resultados de la transfección de $b\rho 2GFP$ en las células HEK 293 en comparación con las HuTu, se observa una distribución a lo largo de la periferia. La Figura 20 muestra la intensidad de la fluorescencia a lo largo de la célula.

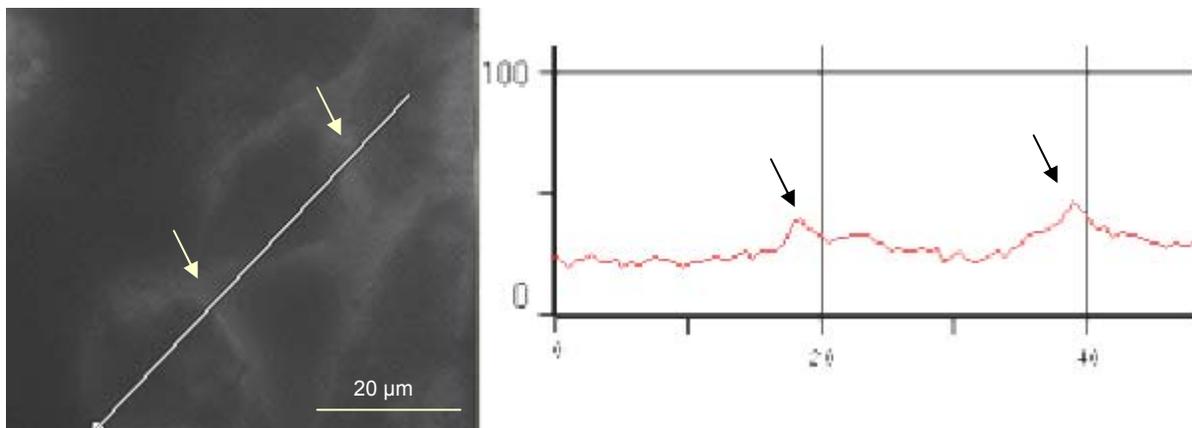


Figura 20. Distribución de la fluorescencia en células HuTu, transfectadas con $p2GFP$. Como se observa, los dos puntos de mayor intensidad de fluorescencia recaen justo en el trazo que hace una línea tangencial a la membrana plasmática de estas células.

Posteriormente, nos interesó evaluar la localización celular de la subunidad ρ2 en cultivos de neuronas por lo que se optó como modelo experimental cultivos primarios de neuronas de cerebelo. Ya que anteriormente estudios de hibridación *in situ*, mostraron su presencia en las células de Purkinje y en células de Golgi (López-Chávez *et al.*, 2005). Estos resultados concuerdan con otros hallazgos en cerebelo de rata en diferentes estadios del desarrollo, en los que se obtuvieron resultados similares (Rozzo *et al.*, 2002; Alakuijala *et al.*, 2005).

Como primer paso, se determinó la existencia de transcritos *in vivo* de la subunidad ρ2 en el cerebelo (en los días de toma de muestra para la realización de cultivos primarios) por medio de la técnica de RT-PCR. Se evaluó el ARN por electroforesis en gel de agarosa (Fig. 21a). Posteriormente, este ARN fue utilizado para determinar la expresión del transcrito de ρ2 durante la ontogenia del cerebelo de rata mediante la técnica de RT-PCR. Se utilizó como control tubulina. Los resultados se muestran en la Figura 21b.

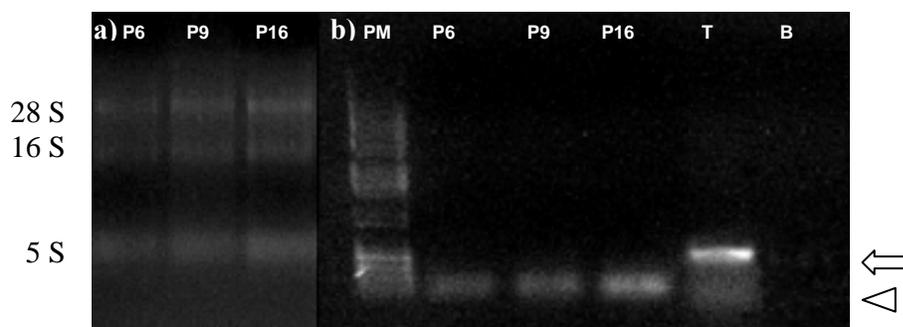


Figura 21.a) Gel de agarosa al 0.8% del ARN extraído de cerebelo de ratas. Se visualizan las bandas correspondientes al ARN de 28, 16 y 5 S, de los días P6, P9, P16 postnatales respectivamente. En b) bandas correspondientes al transcrito de ρ2, cabeza de flecha (300 pb), de los días P6, P9, P16 postnatales respectivamente, tubulina (T) (flecha) y (B) blanco.

Cultivos primarios de células de cerebelo. Los cultivos primarios de las células de cerebelo se muestran en la Figura 22. Como se observa, estos cultivos en su curso temporal no presentaron la morfología característica de las células de

Purkínje. Por lo que para caracterizar su identidad se realizó una inmunohistoquímica contra calbindina (marcador de células de Purkinje). Inicialmente se estandarizó la técnica de inmunodetección contra calbindina en tejidos de cerebelo de bovino (datos no mostrados).

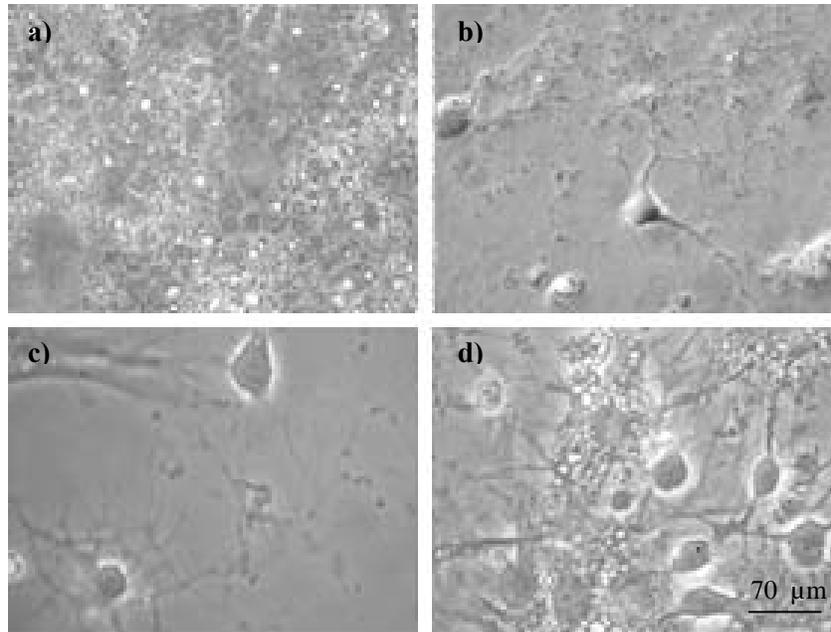


Figura 22. Curso temporal de la diferenciación de cultivos primarios de células de cerebelo a) 1, b) 4, c) 8 y d) 13 días *in vitro*. 40X.

Transfección de cultivos primarios. Se utilizaron los cultivos primarios de células de cerebelo para observar la expresión de la quimera bp2-GFP. La Figura 23 muestra por microscopía de fluorescencia las células a las 96 h pos-transfección 40X.

Después de realizar varios ensayos y haciendo seguimiento a los mismos, se determinó que la mayor expresión de nuestra quimera en estos cultivos, se obtiene en el periodo de 48-96 h, de transfección. En la imagen de la Figura 23a se observa una expresión intensa y homogénea de GFP y para los cultivos transfectados con bp2-GFP (Figura 23b), se observó una expresión de fluorescencia predominantemente

expresado en el soma de la neurona, con alguna fluorescencia intracelular localizada presumiblemente en vesículas de la región perinuclear.

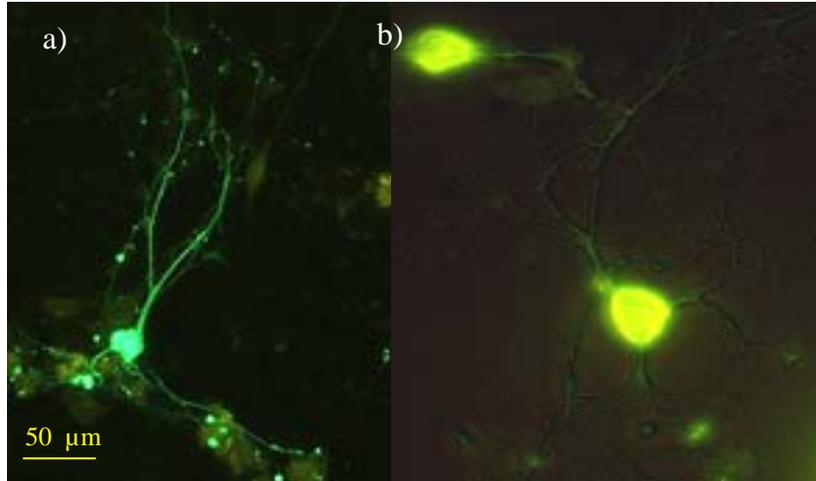


Figura 23. a) Expresión de GFP en cultivos primarios de neuronas de cerebelo. b) Expresión de bρ2GFP en cultivos primarios de neuronas de cerebelo. Estos cultivos fueron transfectados con el plásmido de expresión que codifica para el receptor quimérico bρ2GFP. La imagen por microscopía de epifluorescencia muestra que ésta se encuentra localizada en el soma y en “puntos calientes” a lo largo de la arborescencia dendrítica.

XII. DISCUSIÓN

Actualmente hay un creciente interés en comprender los mecanismos y señales moleculares que dictan la localización de los neuroreceptores en la membrana plasmática. Esto es saber que señales ocurren en la molécula que permiten que el receptor se localice hacia el soma, axón y/o las dendritas. Para este fin, se ha propuesto la generación y uso de genes quiméricos fusionados con proteínas fluorescentes (*Chalfie y Kain, 1998; Miyawaki et al., 2003, Horton et al., 2003; Hu y Kerppola, 2003*); metodología que ha mostrado ser una herramienta poderosa, para el estudio del tráfico intracelular y distribución de los receptores a neurotransmisores y canales iónicos (*Martínez-Torres y Miledi, 2001; Palma et al., 2001*).

En esta propuesta, se utilizó la recientemente clonada y caracterizada subunidad ρ2 del receptor GABA_C bovino, la cual mostró tener todas las propiedades típicas de un receptor tipo GABA_C, y de la cual se determinó su expresión en varias áreas del sistema nervioso central (*López-Chávez et al., 2005*). Por lo que para iniciar esta serie de experimentos y haciendo uso de técnicas de Biología molecular, en combinación con análisis electrofisiológico y por microscopía de fluorescencia, el objetivo de este estudio consistió en la construcción y caracterización de la fusión génica de la subunidad ρ2 con la proteína verde fluorescente (GFP).

Se determinó que la fusión ρ2GFP forma receptores homoméricos funcionales, que generan corrientes activadas por la exposición a GABA, las cuales se desensibilizan muy poco al ser expuestos a su agonista y son antagonizados por TPMPA. La quimera no presenta diferencias significativas con las obtenidas y reportadas para el receptor silvestre ρ2 (*López-Chávez et al., 2005*), ni con el de rata (*Alakuijala et al., 2005 a,b*) y forma eficientemente homómeros funcionales con propiedades similares a los receptores presentes en retina, que no requieren de

ninguna otra subunidad accesoria, aún estando en fusión con la proteína fluorescente (*Martínez-Torres y Miledi, 2001*). Esto contrasta con la mayoría de los receptores GABA_A, los cuales requieren del ensamble de varias subunidades, para formar un receptor funcional (*Schofield et al., 1987*).

Simultáneamente, la fluorescencia emitida por ρ2GFP fue observada en los ovocitos usando microscopía de fluorescencia. Los receptores son anclados preferentemente hacia el polo animal. Resultado que contrasta con el reportado para el receptor nicotínico α7-GFP, en el cual se describe una fuerte expresión que inicia en el hemisferio animal y después de unos días se distribuye a lo largo de la superficie del ovocito (*Palma et al., 2001*). Pero concuerda con los estudios realizados para la subunidad ρ1 GFP (*Martínez-Torres y Miledi, 2001*), con una distribución del receptor primordialmente al polo animal. Esto es derivado tal vez, de una clara asimetría estructural y funcional presentada en el ovocito, ya que la distribución de la tubulina entre los hemisferios vegetal y animal es asimétrica (*Gard, 1994; Gard y Bycong, 1997*). Es decir, los microtúbulos son más numerosos en el polo animal donde se encuentran organizados de manera que mantienen unida la vesícula germinal (núcleo) a la corteza del ovocito. Es precisamente en los microtúbulos en donde se ha propuesto que los receptores GABA_C interactúan con las proteínas asociadas a los mismos (MAPs). Se ha sugerido que la compleja red intracelular formada por el citoesqueleto y microtúbulos, está implicada en el traslado y anclaje correcto de receptores en la superficie celular (*Gingras et al., 2002; Marangi et al., 2000*), tal y como se ha demostrado para algunas proteínas asociadas al citoesqueleto, las cuales presentan un efecto sobre la función de receptores ionotrópicos. Como es el caso de gefirina, la cual no solo ancla al receptor de glicina sino que al asociarse con él modifica sus propiedades (*Kim et al., 2006*). Así mismo, se ha descrito que la proteína de unión a microtúbulos MAP1b interactúa con una región intracelular de ρ1 (*Hanley et al., 1999*). Esta asociación influye notablemente en la distribución subcelular de este receptor a través de la unión entre el receptor y

la proteína en la segunda asa intracelular de p1, anclando al receptor al sistema de microtúbulos. Sin embargo, estos ensayos contrastan con otro reporte (*Meixner et al., 2000*), en donde pese a que se confirmó que MAP1b se une a los microtúbulos y filamentos de actina, se demostró que MAP1b no es un elemento crucial en la expresión y localización de receptores GABA_C; en este trabajo no se encontraron diferencias fundamentadas en el patrón de expresión del receptor en ratones “knock out” de MAP1b con respecto a un silvestre.

Sin embargo, en otro estudio, al observarse la sensibilidad y modulación del receptor GABA_C (*Billups et al., 2001*), se describió la asociación de MAP-1b a la segunda asa intracelular que une a los segmentos transmembranales 3 y 4, en la secuencia RIDTHAIDKYSR, y en específico proponen la sección KY como esencial para esta interacción ya que su mutación previene la unión a MAP-1b. Advirtiéndose con todo esto, que la asociación de MAP-1b con el receptor GABA_C, no solo determina la expresión y localización, sino que además está involucrado con la modulación de la actividad de este receptor.

Contrastando estas observaciones, se puede señalar la posibilidad de que la expresión y localización de estos receptores, esté dictada no sólo por la asociación con proteínas intracelulares MAPs (*Hanley et al., 1999*), sino también por la dinámica del citoesqueleto y/o sus componentes. Por lo que parecería interesante un estudio sobre la disociación de la estructura de microtúbulos, para observar si existe algún impacto en el tráfico, expresión y la funcionalidad del receptor GABA_C.

En nuestras observaciones encontramos una disminución de fluorescencia de los receptores después de 96 h muy probablemente debido a que son reciclados lejos de la membrana plasmática del ovocito. Hecho propuesto también para el receptor 5-HT_{2A} (*Bhattacharyya et al., 2002*), el cual es internalizado en respuesta a la activación por serotonina y subsecuentemente reciclado hacia la superficie, en un

modelo dependiente de la proteína cinasa C (PKC). Por lo que resultaría de especial interés, estudiar si las corrientes originadas por GABA en los receptores GABA_C podrían ser reguladoras también de la internalización del receptor. Como se ha señalado sobre la subunidad ρ1, donde la segunda asa intracelular del receptor posee sitios de modificaciones postraduccionales de fosforilación llevada a cabo por la PKC (*Filippova et al., 1999*).

Una vez evaluada la función y expresión en ovocitos de *X laevis* de bp2GFP, nos interesó estudiar cómo se comportan estos receptores en las neuronas. Para esto, se establecieron transfecciones en cultivos primarios de neuronas de cerebelo.

Como primer paso, se determinó la existencia de transcritos *in vivo* de la subunidad ρ2 en el cerebelo (en los días de toma de muestra para la realización de cultivos primarios) por medio de la técnica de RT-PCR *versus in vitro* (en cultivos primarios de neuronas de cerebelo) por visualización de GFP. Como esperábamos y de acuerdo a reportes previos (*Rozzo et al., 2002; López-Chávez et al., 2005*), identificamos transcritos de la subunidad ρ2 en cerebelo.

La visualización de bp2GFP por medio de fluorescencia en los cultivos primarios de neuronas de cerebelo determinó una distribución preferencial en la membrana plasmática, alrededor del soma y en “puntos calientes” en la arborescencia dendrítica, con alguna fluorescencia intracelular localizada en la región perinuclear. En la membrana plasmática neuronal, los neuroreceptores están localizados a altas concentraciones en los dominios postsinápticos; estos sitios son opuestos a los sitios de liberación del neurotransmisor. Se ha propuesto que el receptor es anclado por una compleja red intracelular de proteínas, por lo que esta acumulación podría explicarse por el origen post-sináptico del receptor quimérico. Siendo un buen candidato para dirigir la localización las MAPs y particularmente MAP 1b (*Hanley et al., 1999*).

Las células HuTu al igual que las neuronas, son células polarizadas y hasta el momento poco se ha descrito sobre el mecanismo de generación y mantenimiento de su polaridad. En estas células encontramos una evidente fluorescencia en la superficie de la membrana. Esta distribución de fluorescencia contrasta marcadamente con las células HuTu transfectadas sólo con GFP, en las cuales se observó que el total del volumen citosólico fue fluorescente. Este resultado es similar al reportado para el acarreador de folato en estas células (*Marchant et al., 2002*).

Para determinar una posible diferencia en la distribución del receptor en células no polarizadas, se realizaron ensayos de transfección en células HEK 293. Los resultados fueron similares a los descritos anteriormente para la subunidad ρ1GFP (*Martínez-Torres y Miledi, 2001*), en donde se observó: a) una distribución de fluorescencia intracelular, y b) una acumulación de esta fluorescencia en diferentes regiones de la membrana plasmática y hacia el hemisferio animal. Lo primero, debido muy probablemente a la falta de una proteína que pudiera estar llevando a cabo o facilitando el anclaje del receptor a la membrana plasmática como pudiera ser la falta de expresión de las MAPs (*Hanley et al., 2000*). Por tanto, las células HEK careciendo de los mecanismos propios de anclaje a la membrana repercuten en una sobreexpresión del receptor en compartimentos intracelulares (*Martínez-Torres y Miledi, 2001*). Observaciones similares se encontraron en los ensayos de co-expresión ρ2-ρ1GFP y ρ1-ρ2GFP, en donde no se vio una clara diferencia en la distribución del receptor bp2GFP, esto posiblemente debido a la falta de mecanismos propios para un correcto anclaje, aunado al hecho de la falta de una proteína del tipo MAPs en las células HEK 293, que interactúe con las subunidades ρ.

Los resultados presentados corroboran estudios descritos anteriormente sobre una dinámica de los receptores localizados en la membrana plasmática (*Miledi, 1959; Birks y Miledi 1960*). Sin embargo, hasta el momento los mecanismos moleculares

que controlan la localización, cantidad y ensamble de receptores no se han esclarecido por completo.

El uso de receptores marcados con proteínas fluorescentes y su visualización por microscopía confocal en tiempo real, en combinación con técnicas de Biología molecular y electrofisiológicas, aunadas al análisis de su biofísica, ayudaría a determinar la ruta de transporte de receptores recientemente traducidos desde los complejos ribosomales hasta su anclaje en la membrana plasmática. Es necesario establecer qué factores afectan el transporte dentro de y fuera de la membrana plasmática y cómo éstos pueden estar funcionando en ciertas condiciones neurológicas, así como describir una posible explicación de la plasticidad de los receptores y de los mecanismos que controlan su reciclaje. Esto, probablemente redituaría en la identificación de nuevos blancos farmacológicos y finalmente en una posible respuesta a preguntas que quedaron abiertas en el trabajo tales como: ¿Qué mecanismos de liberación y/o de retención selectiva contribuyen al mantenimiento de la dinámica (polaridad), del receptor GABA-C ρ 2 en neuronas? ¿El sistema endocítico del receptor, es una estación de distribución directa *versus* liberación directa y/o un paso necesario para la acumulación del receptor? ¿La distribución del receptor es mediada por la distribución diferencial de proteínas de membrana y/o citoesqueleto en los distintos compartimentos neuronales?

XIII. CONCLUSIONES

- Aplicando técnicas de biología molecular el ADNc de la subunidad GABA ρ2 de cerebelo bovino, fue fusionado con la proteína verde fluorescente.
- Por inyección nuclear en ovocitos de *X. laevis* y utilizando la técnica de control de voltaje, se caracterizó electrofisiológicamente a los receptores producidos en la membrana del ovocito.
- Se determinó que la subunidad GABA bp2GFP formó eficientemente receptores GABA_C homoméricos.
- Aplicando ensayos de transfección en las líneas celulares HEK 293, HuTu 80 y en cultivos primarios de cerebelo de rata, se determinó la expresión del plásmido de expresión que codifica para el receptor quimérico GABA bp2GFP

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Residuos aminoacídicos del sitio de unión al ligando en los Cys loop”	8
Figura 2. Diagrama de los receptores GABA _c	12
Figura 3. Modelo topológico de las subunidades de los receptores GABA _c	13
Figura 4. Localización del gen ρ2	17
Figura 5. Estrategia de clonación y subclonación de bp2 y p2GFP	28
Figura 6. Ovocito de <i>Xenopus laevis</i>	31
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico del vector pGEMT-Easy y liberación del inserto por <i>EcoR</i> I y <i>BamH</i> I	38
Figura 8. Electroforetograma	39
Figura 9. Caracterización enzimática y mapa de restricción funcional de pEGFP-N2-bp2	39
Figura 10. Microscopia de fluorescencia de ovocitos de <i>X. laevis</i>	40
Figura 11. Microscopia confocal de fluorescencia en “z scan” de ovocitos de <i>X. laevis</i>	41
Figura 12. Caracterización funcional de bp2 y de bp2GFP en ovocitos de <i>X. laevis</i>	42
Figura 13. Caracterización funcional de bp2GFP en ovocitos de <i>X. laevis</i> TPMPA	42
Figura 14. Ensayo de intensidad de fluorescencia en ovocitos	43
Figura 15. Transfección bp2GFP y GFP en células HEK 293	44
Figura 16. Inmunohistoquímica de la transfección bp2GFP en células HEK 293	45
Figura 17. Inmunohistoquímica de la transfección GFP en células HEK 293	45
Figura 18. Microscopia de fluorescencia de células HEK 293 co-transfección	46
Figura 19. Cultivo de células HuTu expresando bp2GFP y GFP	47
Figura 20. Ensayo de intensidad de fluorescencia en células HuTu	47
Figura 21. ARN total de cerebelo de rata y T-PCR de cerebelo de rata	48
Figura 22. Curso temporal del cultivo primario de cerebelo	49
Figura 23. Cultivo primario de cerebelo expresando GFP y bp2GFP	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de PCR mutagénica	25
Tabla 2. Ensayo de ligación	27
Tabla 3. Digestión de ADN plasmídico	28
Tabla 4. Liberación de inserto de pGEM-T	29
Tabla 5. Digestión del vector pEGFP-N2	29
Tabla 6. Reacción de ligación pEGFP-N2 y bp2GFP	29
Tabla 7. Reacción de retrotranscripción y PCR	37

ABREVIACIÓN EMPLEADA

BC₅₀	constante media de unión
BLAST	herramienta básica de búsqueda local de alineación
BSA	albúmina sérica bovina
D-MEM	medio mínimo esencial D-galactopiranosido
ADN	ácido desoxiribonucleico
EC₅₀	concentración media del agonista, que produce el 50% del efecto máximo observado
dNTP's	desoxiribonucleosidos trifosfatos
GABA	ácido γ-aminobutírico
GABA_A	receptores tipo A del ácido γ-amino butírico
GABA_B	receptores tipo B del ácido γ-amino butírico
GABA_C	receptores tipo C del ácido γ-amino butírico
GFP	proteína verde fluorescente
h	horas
HEK	células humanas embrionarias de riñón
IHQ	inmunohistoquímica
IPTG	isopropil β D-tiogalactósido
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
nAChR	receptores acetilcolinérgicos
pb	pares de bases
PBS	amortiguador salino de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
ARN	ácido ribonucleico
RT-PCR	retrotranscripción-PCR
Taq	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
U	unidades de enzima
U.V.	luz ultravioleta
X	veces la concentración
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
µg	microgramos
µl	microlitros

APÉNDICE A

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA SALINA –FOSFATOS 10X (PBS)

80 g de NaCl (Sigma)

2 g de KCl (Sigma)

14.4 g de Na₂HPO₄ (Sigma)

2.4 g de KH₂PO₄. (Sigma)

Se agrega H₂O destilada, se ajusta el pH a 7.4 y se afora a 1000 ml. Se filtra y se guarda a temperatura ambiente.

PARAFORMALDEHIDO 4 %

Paraformaldehido (Sigma)

0.4 g de paraformaldehido

6 ml de PBS 1X , se lleva a 60°C para homogenizar con barra magnética

Se afora a 10 ml con PBS 1X.

H₂O DEPC

Agregar 1 ml de dietilpircarbonato (DEPC) a 1000 ml de H₂O bidestilada

Agitar vigorosamente la solución y colocarla a 37°C por 12 h

Esterilizar en autoclave a 120°C por 20 minutos

Almacenar a temperatura ambiente

Solución D

Disolver 125 g de isotiocianato de guanidina en 146.5 ml de H₂O DEPC

Calentar 65°C

Agregar 8.8 ml de citrato de sodio 0.75 M pH 7 y 13.2 ml de sarcosal al 10 %

Se prepara agregando 0.36 ml de β-mercaptoetanol a 50 ml de la solución patrón justo antes de iniciar el experimento.

Medio LB líquido

25 g de LB (triptona 1%, NaCl 1% y extracto de levadura 0.5%) por cada litro de solución.

Colocar en autoclave a 120°C por 20 minutos.

Almacenar a 4°C o a -20°C.

Cajas de Petri con medio

LB-Agar 2%

25 g de LB por cada litro de solución.

Adicionar 20 g de agar por cada litro de solución.

Colocar en autoclave a 120°C por 20 minutos.

Agregar antibiótico, si se desea, cuando la temperatura del medio haya descendido a menos de 50°C.

Vaciar el contenido en cajas de Petri.

Esperar a que solidifique el medio y almacenar a 4°C.

Antibióticos

Se puede agregar antibiótico al medio preparado después de esterilizarlo. El medio LB líquido se puede almacenar en refrigeración o en congelación y en el momento en que sea necesario se puede adicionar el antibiótico deseado. En el caso del agar LB, se debe agregar el antibiótico después de sacarlo del autoclave y antes de que solidifique. Las concentraciones a las que se utiliza son las siguientes:

La solución de almacén del antibiótico a trabajar, se puede colocar en alícuotas de 1ml o 500 µl a -20°C, para utilizarse una sola vez. Esto es debido a que son sensibles a la temperatura (y luz para el caso de la kanamicina) y el descongelamiento frecuente puede inactivarlas. La solución de trabajo para ampicilina y kanamicina fue de 100 µg/ml.

APÉNDICE B

RINGER DE RANA

	Concentración	peso molecular	g/20 litros Ringer
NaCl	115 mM	58.44	67.206
CaCl ₂	18 mM	147.02	2.616
KCl	2 mM	74.55	1.491
HEPES	5 mM	238.33	11.95

SOLUCIÓN BARTH

	Concentración	peso molecular	g/2 litros Barth
NaCl	88 mM	58.44	10.284
KCl	1 mM	74.55	0.1490
NaHCO ₃	2.4 mM	84.01	0.402
MgSO ₄	0.82 mM	246.48	0.404
Ca(NO ₃) ₂	0.33 mM	236.15	0.1558
CaCl ₂	0.41 mM	147.02	0.1204
HEPES	5 mM	238.33	2.382

REFERENCIAS

- Akabas MH, Stauffer DA, Xu M, Karlin A. A. (1992) Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. Science **258**:307-310
- Akasu T, Munakata Y, Tsurusaki M, Hasuo H. (1999) Role of GABA_A and GABA_C receptors in the biphasic GABA responses in neurons of the rat major pelvic ganglia. J Neurophysiol. **82**(3):1489-96.
- Alakuijala A, Palgi M, Wegelius K, Schmidt M, Enz R, Paulin L, Saarma M, Pasternack M. (2005) GABA receptor ρ subunit expression in the developing rat brain. Brain Res Dev Brain Res. **154**(1):15-23.
- Alakuijala A, TalviOja K, Pasternack A, Pasternack M. (2005) Functional characterization of rat ρ2 subunits expressed in HEK 293 cells. Eur J Neurosci. **21**(3):692-700.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). Molecular Biology of the Cell New York: Garland Science
- Albrecht BE y Darlison MG (1995) Localization of the ρ1- and ρ2-subunit messenger RNAs in chick retina by *in situ* hybridization predicts the existence of gamma-aminobutyric acid type C receptor subtypes. Neurosci Lett **183**:155-158.
- Albrecht BE, Breitenbach U, Stuhmer T, Harvey RJ and Darlison MG (1997) *In situ* hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction studies on the expression of the GABAC receptor ρ1- and ρ2-subunit genes in avian and rat brain. Eur J Neurosci **9**(11):2414-2422.
- Amin, J. Weiss, D.S. (1996) Insights into the activation mechanism of ρ1 GABA receptors obtained by coexpression of wild type and activation-impaired subunits Proc. Res. Soc. **263**:273-282
- Bailey ME, Albrecht BE, Johnson KJ, Darlison MG.(1999) Genetic linkage and radiation hybrid mapping of the three human GABAC receptor ρ subunit genes: GABRR1, GABRR2 and GABRR3. Biochim Biophys Acta **1447**(2-3):307–312.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. (1998)International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. Pharmacol Rev **50**:291–313
- Bhattacharyya S, Puri S, Miledi R, Panicker MM. (2002) Internalization and recycling of 5-HT_{2A} receptors activated by serotonin and protein kinase C-mediated mechanisms. Proc Natl Acad Sci **22**:14470-5
- Billups D, Hanley JG, Orme M, Attwell D, Moss SJ. (2001) GABA_C Receptor Sensitivity Is Modulated by Interaction with MAP-1b. J Neurosci **23**:8643-8650.

- Birks R, Katz B, Miledi R. (1960) Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction in the course of nerve degeneration. J Physiol. **150**:145-68
- Bormann J. (1988) Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. Trends Neurosci **11**:112–116
- Bormann J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. Trends Pharmacol Sci. **21**(1):16-9.
- Bormann J, Feigenspan A. (1995) GABAC receptors. Trends Neurosci **18**:515–519
- Boue-Grabot E, Dufy B and Garret M (1995) Molecular diversity of GABA-gated chloride channels in the rat anterior pituitary. Brain Res **704**(1):125-9.
- Boue-Grabot E, Roudbaraki M, Bascles L, Tramu G, Bloch B, Garret M. (1998) Expression of GABA receptor ρ subunits in rat brain. J. Neurochem **70**:899–907
- Calvo DJ, Vazquez AE, Miledi R. (1994) Cationic modulation of $\rho 1$ type γ -aminobutyrate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Proc Natl Acad Sci **91**:2725-12729
- Carland JE, Moorhouse AJ, Barry PH, Johnston GAR, Chebib M. 2004 Charged Residues at the 2' Position of Human GABA_C $\rho 1$ Receptors Invert Ion Selectivity and Influence Open State Probability J. Biol Chem. **279**;52:54153–54160
- Celie PH, van Rossum-Fikkert SE, van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB, Sixma TK. (2004) Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. Neuron **41**:907–914
- Chalfie M, Kain S. (1998) Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols. New York. Wiley-Liss.
- Chang Y, Weiss DS. (1999) Channel opening locks agonist onto the GABAC receptor. Nat Neurosci **2**:219–225
- Chebib, M. (2004) GABA receptor ion channels. Clin Exp Pharmacol Physiol **31**:800–804.
- Cherubini E, Strata F. (1997) GABAC receptors: a novel receptor family with unusual pharmacology. News Physiol Sci **12**:136–141
- Chiara DC, Trinidad JC, Wang D, Ziebell MR, Sullivan D, Cohen (2003) Identification of Amino Acids in the Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist Binding Site and Ion Channel Photolabeled by 4-[(3-Trifluoromethyl)-3H-Diazirin-3-yl]Benzoylcholine, a Novel Photoaffinity Antagonist. Biochemistry **42**:271–283
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. **162**(1):156-9.
- Cromer BA, Morton CJ, Parker MW. (2002) Anxiety over GABA(A) receptor structure relieved by AChBP. Trends Biochem Sci **27**:280–287

Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kasch LM, Montrose-Rafizadeh C, Donovan DM, Shimada S, Antonarakis SE, Guggino WB, Uhl GR. (1991) Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) ρ 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. Proc Natl Acad Sci **88**:2673–2677

Cutting GR., S. Curristin, H. Zoghbi, B. O'Hara, M.F. Seldin, G.R. Uhl (1992) Identification of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit ρ 2 cDNA and colocalization of the genes encoding ρ 2 (GABRR2) and ρ 1 (GABRR1) to human chromosome 6q14- q21 and mouse chromosome 4. Genomics **12**:801–806

Demuro A, Martinez-Torres A, Miledi R. (2000) Functional and pharmacological properties of GABA ρ 1 Δ 51 receptors. Neurosci Res **36**:141–146.

Dong CJ and Werblin FS (1995) Zinc downmodulates the GABA_C receptor current in cone horizontal cells acutely isolated from the catfish retina. J Neurophys **73**(2):916-919.

Dong CJ, Picaud SA, Werblin FS. (1994) GABA transporters and GABA_C-like receptors on catfish cone- but not rod-driven horizontal cells. J Neurosci. **14**(5 Pt 1):2648-58.

Duke RK, Chebib M, Balcar V, Allan RD, Mewett KN, Johnston GAR. (2000) (+) and (-)-cis-2-aminomethylcyclopropanecarboxylic acids show opposite pharmacology at recombinant ρ 1 and ρ 2 GABA_C receptors. J Neurochem **75**:2602-2610.

Enna S. J., Bowery N. G. (1997). The GABA Receptors. Second Edition. Humana Press USA pp.1, 297-317

Enz R. y Cutting GR. (1999) GABA_C receptor ρ subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. Eur J Neurosci **11**:41–50

Enz R, Brandstatter JH, Hartveit E, Wassle H, Bormann J. (1995) Expression of GABA receptor ρ 1 and ρ 2 subunits in the retina and brain of the rat. Eur. J. Neurosci. **7**:1495–1501

Enz R, Brandstatter JH, Wassle H and Bormann J (1996) Immunocytochemical localization of the GABA_C receptor ρ subunits in the mammalian retina. J Neurosci **16**(14):4479-4490.

Euler T, Masland RH. (2000) Light-evoked responses of bipolar cells in a mammalian retina. J Neurophysiol. **83**(4):1817-29.

Euler T, Schneider H, Wassle H. (1996) Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. J Neurosci. **16**(9):2934-44.

Feigenspan A y Bormann J (1994) Differential pharmacology of GABA_A and GABA_C receptors on rat retinal bipolar cells. Eur J Pharmacol **288**(1):97-104.

Feigenspan A, Wassle H, Bormann J. (1993) Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. Nature. **361**(6408):159-62.

Filippova N, Dudley R. Weiss DS. (1999) Evidence for phosphorylation-dependent internalization of recombinant human ρ 1 GABA_C. J Physiol **518**(Pt 2):385-99

- Fletcher, E.L., Clark, M. M., Senior, P. y Furness, J.B. (2001). Gene expression and localization of GABA_C receptors in neurons of the rat gastrointestinal tract.. Neurosci. **107**:181-18
- Furuya, S., Makino, A. y Hirabayashi Y. (1998). An improved method for culturing cerebellar Purkinje cells with differentiated dendrites under a mixed monolayer setting. Brain. Protocols Res. **3**:192-198.
- Gao Zhan-Guo y Jacobson Kenneth A (2006) Allosterism in membrane receptors. Drug Discov Today. **11**(5-6):191-202.
- Gard DL. (1994) γ-tubulin is asymmetrically distributed in the cortex of *Xenopus* oocytes. Dev Biol. **161**(1):131-40.
- Gard D. L., Bycong J. Ch. (1997) The Organization and Animal-Vegetal Asimetry of Cytokeratin Filaments in Stage VI *Xenopus* oocytes is Dependent Upon F-Actin and microtubules. Developmental Biology **184**:95-114.
- Gingras J., Rassadi S., Cooper E., Ferns M. (2002). Agrin plays an organizing role in the formation of sympathetic synapses. J Cell Biol. **158**(6):1109–1118.
- Goutman JD, Escobar A.L. Calvo DJ. (2005) Analysis of macroscopic ionic currents mediated by GABA_Aρ1 receptors during lanthanide modulation predicts novel states controlling channel gating. British J Pharmacol 1-10
- Greka A, Koolen JA, Lipton SA, Zhang D. Cloning and characterization of mouse GABA_C receptor subunits. NeuroReport **9**:229–232
- Gundersen, C.B. Miledi, R. y Parker, I. (1983) Voltage-operated channels induced by foreign messenger RNA in *Xenopus* oocytes. Proc. Res. Soc. Lond. **B220**:131-140
- Gundersen, C.B. Miledi, R. y Parker, I. (1984) Messenger RNA from human brain induces drug and voltage-operated channels in *Xenopus* oocytes. Nature, Lond. **308**:421-424
- Hackam AS, Wang TL, Guggino WB, Cutting GR. (1997) The N-terminal domain of human GABA receptor ρ1 subunits contains signals for homooligomeric and heterooligomeric interaction. J. Biol. Chem. **272**:13750–13757
- Hanley J, Jones E, Moss S. (2000) GABA Receptor ρ1 Subunit Interacts with a Novel Splice Variant of the Glycine Transporter, GLYT-1. J Biol Chem **276**:840-846.
- Hanley JG, Koulen P, Bedford F, Gordon-Weeks PR, Moss SJ. (1999) The protein MAP-1B links GABA(C) receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. Nature. **397**:66-9.
- Harrison NJ, Lummis SCR. (2005). Molecular modeling of the GABA_C receptor ligand-binding domain. J Mol Model **26**:1-8

- Hille B. (2001) Ion channel of excitable membranes. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc
- Horton, A. y Ehlers, M. (2003) Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. J. Neurosci. **23**:6188-6199
- Hu CD, Kerppola TK. (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. Nat Biotechnol. **21**(5):539-45.
- Jansen, A., M. Hoepfner, K. H. Herzig, E. O. Riecken y H. Scherubl. (2000) "GABA(C) receptors in neuroendocrine gut cells: a new GABA-binding site in the gut. Pflugers Arch. **441**(2-3):294-300.
- Johnston, G.A.R. (1986) Multiplicity of GABA receptors. in Receptor Biochemistry and Methodology, (eds. Olsen R.W. & Venter, J.C.) Alan R. Liss, Inc., **5**:57-71
- Johnston, GAR. (1996) GABA_C receptors: relatively simple transmitter gated ion channels? Trends Pharmacol Sci **17**:319–323
- Johnston A.R. (2002) Medicinal chemistry and molecular pharmacology of GABA_C receptors Current Topics Med Chem **2**:903-913
- Kandel, E. James S., y Thomas J. (2000). Principles of Neural Science. 4th ed. McGraw-Hill, New York.
- Kaneda M, Mochizuki M, Aoki K, Kaneko A.(1997) Modulation of GABA_C response by Ca²⁺ and other divalent cations in horizontal cells of the catfish retina. J Gen Physiol. **110**:741-7
- Kaneda, M, Andrasfalvy B, Kaneko A. (2000) Modulation by Zn²⁺ of GABA responses in bipolar cells of the mouse retina. Vis Neurosci **17**:273-81
- Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, Luo L, Ryan AF. (1999) Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. J Comp Neurol. **407**(1):11-32.
- Katjusĭa Brejc, Willem J. van Dijk, Remco V. Klaassen, Mascha Schuurmans, John van der Oost, August B. Smit y Titia K. Sixma (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. Nature **411**:269-276
- Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH (2004) Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. Prog Biophys Mol Biol **86**:161-204
- Kim EY, Schrader N, Smolinsky B, Bedet C, Vannier C, Schwarz G, Schindelin H. (2006) Deciphering the structural framework of glycine receptor anchoring by gephyrin. EMBO J. **25**(6):1385-95
- Koulen P, Brandstatter JH, Enz R, Bormann J, Wassle H. (1998) Synaptic clustering of GABA(C) receptor rho-subunits in the rat retina. Eur J Neurosci. **10**(1):115-27.

Koulen P, Brandstatter JH, Kroger S, Enz R, Bormann J and Wassle H (1997) Immunocytochemical localization of the GABA(C) receptor rho subunits in the cat, goldfish, and chicken retina. J Comp Neurol **380**(4):520-532.

Krnjevic' K y Phillis J W. (1963). Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. J. Physiol. **165**:274-304.

Lester HA, Dibas MI, Dahan D, Leite JF, Dougherty DA. (2004) Cys-loop Receptors: New Twists and Turns. Trends Neurosci. 27329–336

Le Novere N, Changeux J. (1999). The ligand gated ion channel database. Nucleic Acids Res. **27**:340-342

Le Novere N, Grutter T, Changeux JP. (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. Proc Natl Acad Sci **99**:3210–3215

Leonard, R. J., Labarca, C. G., Charnet, P., Davidson, N., and Lester, H. A. (1988) Evidence that the M2 membrane-spanning region lines the ion channel pore of the nicotinic receptor. Science **242**:578-1581

Liu, B Hattori, N. Jiang, B. Nakayama, Y. Zhang, N. Wu, B. Kitagawa, K. Taketo, Matsuda, H. Inagaki, C. (2004) Single cell RT-PCR demonstrates differential expression of GABA_C receptor ρ subunits in rat hippocampal pyramidal and granule cells. Mol Brain Res. **123**:1-6

Lopez-Chavez A, Miledi R, Martinez-Torres A. (2005) Cloning and functional expression of the bovine GABA(C) ρ2 subunit Molecular evidence of a widespread distribution in the CNS. Neurosci Res **53**:421-7.

Lukasiewicz PD. (1996) GABAC receptors in the vertebrate retina. Mol. Neurobiol. **12**:181–194

Lukasiewicz PD y Shields CR (1998) Different combinations of GABA_A and GABA_C receptors confer distinct temporal properties to retinal synaptic responses. J Neurophys **79**(6):3157-3167.

Lukasiewicz PD y Werblin FS (1994) A novel GABA receptor modulates synaptic transmission from bipolar to ganglion and amacrine cells in the tiger salamander retina. J Neurosci **14**(3):1213-1223.

Lummis SCR, Beene DL, Harrison NJ, Lester HA, Dougherty DA. (2005) A cation-π binding interaction with a Tyrosine in the binding site of the GABA_C receptor Chem Biol **12**:993-97

Maksay G, Bikadi Z, Simonyi M. (2003) Binding interactions of antagonists with 5-hydroxytryptamine_{3A} receptor models. J Recept Signal Transduct Res **23**:255–270

Marangi P., Wieland S., Fuhrer Ch. (2000). Laminin-1 redistributes postsynaptic proteins and requires rapsyn, tyrosine phosphorylation, and Src and Fyn to stably cluster acetylcholine receptors. J Cell Biol. **157**:883–895.

Marchant JS., Subramanian VS., Parker I. y Said HM. (2002) Intracellular Trafficking and Membrane Targeting Mechanisms of the Human Reduced Folate Carrier in Mammalian Epithelial Cells. J. Biol Chem **277**(36):33325–33333.

Martínez-Delgado G. (2002) Obtención de anticuerpos policlonales anti ornitina descarboxilasa por inmunización intra-esplénica. Tesis Licenciatura UNAM

Martinez-Torres A, Demuro A, Miledi R. (2000) GABA ρ 1/GABAA α 1 receptor chimeras to study receptor desensitization. Proc Natl Acad Sci **97**(7):3562-6.

Martinez-Torres A, Miledi R. (2001) Expression of γ -aminobutyric acid ρ 1 and ρ 1 Δ 450 as gene fusions with the green fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci **13**;98(4):1947-51.

Martinez-Martinez A, Reyes-Ruiz JM, Martinez-Torres A, Miledi R. (2004) Functional expression in frog oocytes of human ρ receptors produced in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci **101**(2):682-6.

Martinez-Torres, A, Vazquez AE, Panicker MM, Miledi R. (1998) Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the ρ 1 γ -aminobutyrate receptor. Proc Natl Acad Sci **95**:4019 – 4022.

McCormick DA. (1999) Membrane Potencial and Action potencial. En: Fundamental Neuroscience. Michael J. Zigmond. Bloom, Roberts and Squiere. 129-54

Meixner A., Haverkamp S., Wässle H., Führer S., Thalhammer J., Kropf N., Bittner R., Lassmann H., Wiche G., Propst F. (2000). MAP1B Is Required for Axon Guidance and Is Involved in the Development of the Central and Peripheral Nervous System. J Cell Biol **151**:1169-1178.

Miledi R. (1959) Acetylcholine sensitivity of partially denervated frog muscle fibers. J. Physiol. **147**:45-46.

Miledi R. (1982) A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. Proc R Soc Lond B Biol Sci. **215**(1201):491-7.

Miledi R, Parker I. Sumikawa K (1982) Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. EMBO **1**(11):1307-12

Milligan CJ, Buckley NJ, Garret M, Deuchars J, Deuchars SA. (2004) Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABAA and GABAC receptor subunits in native central neurons. J Neurosci. **24**(33):7241-50.

Miyawaki, A., Sawano, A. y Kogure, T. (2003). Lighting up cells: labeling proteins with fluorophores. Imaging Cell Biol. S1-S14.

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. Nature **423**:949–955

Moss SJ, Smart TG. (2001) Constructing inhibitory synapses Nature Reviews Neuros **2**:240-50

- Murata Y, Woodward RM, Miledi R, Overman LE. (1996) The first selective antagonist for the GABAC receptor. Biomed Chem Lett **6**:2073-2076.
- O'hara, B.F. Andretic, R., Heller, H.C., Carter, D.B., Kilduff, T.S. (1995) GABA_A, GABA_C, and NMDA receptor subunit expression in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. Brain Res Mol. **28**(2):239-250.
- Ogurusu T, Shingai R. (1996) Cloning of a putative γ-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit ρ3 cDNA. Biochim Biophys Acta **1305**:15–18.
- Ogurusu T, Taira H, Shingai R. (1995) Identification of GABA_A receptor subunits in rat retina: cloning of the rat GABA_A receptor ρ2 subunit cDNA. J Neurochem **65**:964–968
- Pan ZH y Lipton SA (1995) Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals. J Neurosci **15**(4):2668-2679.
- Pan Y, Khalili P, Ripps H, Qian H. (2005) Pharmacology of GABAC receptors: responses to agonists and antagonists distinguish A- and B-subtypes of homomeric ρ receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Neurosci Lett. **376**(1):60-5
- Pan Y, Qian H. (2005). Interactions between ρ and γ2 subunits of the GABA receptor. J Neurochem. **94**(2):482-90.
- Palma, E., Mileo, A., Martínez, A., Eusebi, F. Y Miledi, R. (2001). Some properties of human neuronal α7 nicotinic acetylcholine receptors fused to the green fluorescen protein. Proc. Natl. Acad. Sci. **99**:3950-3955
- Pasternack M, Boller M, Pau B, Schmidt M. (1999) GABA(A) and GABA(C) receptors have contrasting effects on excitability in superior colliculus. J Neurophysiol **82**(4):2020-3.
- Pattnaik B, Jellali A, Sahel J, Dreyfus H, Picaud S. (2000) GABAC receptors are localized with microtubule-associated protein 1B in mammalian cone photoreceptors. J Neurosci. **20**(18):6789-96.
- Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. (1991) Expression of mammalian g-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. Proc Natl Acad Sci **88**:4318-4322.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Katz, L., Lamantia, A.S. y Mcnamara J. (1997). Neuroscience. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Qian H y Dowling JE (1993) Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. Nature **361**(6408):162-164.
- Qian H y Dowling JE (1995) GABAA and GABAC receptors on hybrid bass retinal bipolar cells. J Neurophys **74**(5):1920-1928.
- Qian H, Dowling JE, Ripps H. (1998) Molecular and pharmacological properties of GABA ρ-subunits from white perch retina. J Neurobiol **37**:305–320

Qian H, Hyatt G, Schanzer A, Hazra R, Hackam AS, Cutting GR, Dowling JE. (1997) A comparison of GABAC and ρ subunit receptors from the white perch retina. Vis Neurosci. **14**(5):843-51.

Qian, H. y Pan, Y. (2002) Co-assembly of GABA rho subunits with the GABA(A) receptor γ(2) subunit cloned from white perch retina. Brain Res Mol Brain Res 103; 62-70

Qian H and Ripps H (1999) Response kinetics and pharmacological properties of heteromeric receptors formed by coassembly of heteromeric receptors formed by coassembly of GABA ρ- and γ2-subunits. Proc R Soc Lond **B 266**:2419-2425.

Ragozzino D, Woodward RM, Murata Y, Eusebi F, Overman LE, Miledi R. (1996). Design and in vitro pharmacology of a selective γ- aminobutyric acid C receptor antagonist. Mol Pharmacol **50**:1024-1030.

Reeves DC, Sayed MF, Chau PL, Price KL, Lumms SC. (2003) Prediction of 5-HT₃ receptor agonist-binding residues using homology modeling. Biophys J **84**:2338–2344

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. (1999) The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. Nature **397**:251– 255

Roska B, Nemeth E, Orzo L, Werblin FS. (2000) Three levels of lateral inhibition: A space-time study of the retina of the tiger salamander. J Neurosci. **20**(5):1941-51.

Rozzo A, Armellin Mara, Franzot J, Chiaruttini, Nistri A, Tongiorgi E. (2002). Expression and dendritic mRNA localization of GABA_C receptor ρ1 and ρ2 subunits in developing rat brain and spinal cord. Eur. J. Neur. **15**:1747-1758.

Sambrook, J., y Russel DW. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. Plaining N.Y.

Schapiro M, Abagyan R, Totrov M. (2002) Structural model of nicotinic acetylcholine receptor isotypes bound to acetylcholine and nicotine. BMC Struct Biol 2:1

Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA. (1987) Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. Nature. **328**:221-7.

Shields CR, Tran MN, Wong RO, Lukasiewicz PD. (2000) Distinct ionotropic GABA receptors mediate presynaptic and postsynaptic inhibition in retinal bipolar cells. J Neurosci. **20**(7):2673-82.

Shimada S, Cutting G, Uhl GR. (1992) γ-aminobutyric acid A or C receptor? γ-aminobutyric acid ρ1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepineinsensitive γ-aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. Mol Pharmacol **41**:683– 687

Simeone, A., Donevan, S. Rho, J. (2003). Molecular biology and ontogeny of γ -aminobutyric acid (GABA) receptors in the mammalian central nervous system. J. Child Neur. **18**:39-48

Sivilotti L, Nistri A. (1991) GABA receptor mechanisms in the central nervous system. Prog Neurobiol **36**:35–92

Stein V, Nicoll RA. (2003). GABA generates excitement. Neuron. **37**(3):375-8.

Stojilkovic SS, Tomic M, Van Goor F, Koshimizu T. (2000) Expression of purinergic P2X2 receptor-channels and their role in calcium signaling in pituitary cells. Biochem Cell Biol. **78**(3):393-404.

Suarez A., G□ttler A., Strätz M., Staendner L., Timmis K., Guzamn C. (1997). Construction of Green Fluorescent Protein based Vectors for Genetic Analysis in Bacteria. Archives Pharmaceutica **38**(4):1947-1951.

Subramanian VS, Marchant JS, Parker I, Said HM. (2001) Intracellular trafficking/membrane targeting of human reduced folate carrier expressed in *Xenopus* oocytes. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. **281**(6):G1477-86.

Sumikawa K, Parker I, Amano T, and Miledi R. (1984) Separate fractions of mRNA from Torpedo electric organ induce chloride channels and acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. EMBO **3**:2291-2294

Unwin N. (1995) Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. Nature **373**:37–43

Vulchanova L, Riedl MS, Shuster J, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R. (1997) Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. Neuropharmacol **36**:1229–1242.

Wang TL, Guggino WB, Cutting GR. (1994) A novel γ -aminobutyric acid receptor subunit (ρ 2) cloned from human retina forms bicuculline-insensitive homooligomeric receptors in *Xenopus* oocytes. J Neurosci **14**:6524–6531

Wang TL, Hackam AS, Guggino WB, Cutting GR. (1995) A single amino acid in γ -aminobutyric acid ρ 1 receptors affects competitive and noncompetitive components of picrotoxin inhibition. Proc Natl Acad Sci **9**(2):11751-11755.

Wegelius K, Pasternack M, Hiltunen JO, Rivera C, Kaila K, Saarma M, Reeben M. (1998) Distribution of GABA receptor ρ subunit transcripts in the rat brain. Eur J Neurosci **10**:350–357

Wellis DP, Werblin FS. (1994) Dopamine modulates GABA_c receptors mediating inhibition of calcium entry into and transmitter release from bipolar cell terminals in tiger salamander retina. J Neurosci. **15**(7 Pt 1):4748-61.

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

Woodward RM, Polenzani L, Miledi R. (1993) Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (ρ-like) γ-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of γ-aminobutyric acid A and γ-aminobutyric acid B receptor agonists and antagonists. Mol Pharmacol **43**:609-25

Woodson W, Nitecka L, Ben-Ari Y. (1989) Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. J Comp Neurol **280**:254–271.

Wu Y, Cutting GR. (2001) Developmentally regulated expression of GABA receptor ρ1 and ρ2 subunits, L7 and cone-rod homeobox (CRX) genes in mouse retina. Brain Res. **912**(1):1-8.

Xu M, Akabas MH. (1993) Amino acids lining the channel of the γ-aminobutyric acid type A receptor identified by cysteine substitution. J Biol Chem. **268**:21505-21508

Xu M, Akabas MH. (1996) Identification of channel-lining residues in the M2 membrane-spanning segment of the GABA(A) receptor α1 subunit. J Gen Physiol. **107**:195-205

Xue H (1998) Identification of major phylogenetic branches of inhibitory ligand-gated channel receptors. J Mol Evol **7**(3):323-333.

Yamashita M, Ikemoto Y, Nielsen M, Yano T. (1999) Effects of isoflurane and hexafluorodiethyl ether on human recombinant GABA(A) receptors expressed in Sf9 cells. Eur J Pharmacol **378**(2):223-31

Yeh HH, Grigorenko EV and Veruki ML (1996) Correlation between a bicuculline-resistant response to GABA and GABAA receptor ρ1 subunit expression in single rat retinal bipolar cells. Visual Neurosci **13**(2):283- 292.

Zhang D, Pan ZH, Awobuluyi M, Lipton SA. (2001) Structure and function of GABA_C receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. Trends Pharmacol Sci **22**:121–132

Zhang D, Pan ZH, Zhang X, Brideau AD, Lipton SA. (1995) Cloning of a γ-aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. Proc Natl Acad Sci **92**:11756–11760

Zhang J y Slaughter MM (1995) Preferential suppression of the On pathway by GABA_C receptors in the amphibian retina. J Neurophys **74**(4):1583-1592.

Zheng W, Xie W, Zhang J, Strong JA, Wang L, Yu L, Xu M, Lu L. (2003) Function of γ-aminobutyric acid receptor/channel ρ1 subunits in spinal cord. J Biol Chem. **278**(48):48321-9.

Zigmond MJ, Bloom FE, (1999) Landis SC, Roberts JL, Squire LR. Eds Fundamental Neuroscience. San Diego, Cal: Academic Press