

---

---

Construcción y caracterización funcional de  
mutantes puntuales del residuo L9' del  
segundo segmento transmembranal del  
neurorreceptor humano  
GABA- $\rho$ 1



Entidad Académica, Instituto de Neurobiología  
Universidad Nacional Autónoma de México

TESIS QUE PARA OBTENER EL  
**GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
PRESENTA

Argel Raúl Estrada Mondragón

DIRECTOR DE TESIS:

**Dr. Ataúlfo Martínez Torres**

*Campus Juriquilla, Querétaro*



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.

---

---

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mis padres y a mi hermana, por todo su amor y apoyo incondicional durante estos largos años.

Agradezco además:

A mi familia, por sus valiosos consejos

A mi tutor y amigo, Dr. Ataúlfo Martínez, que sin su valiosa guía este proyecto no habría sido posible; así como a nuestro profesor, Dr. Ricardo Miledi que siempre siguió de cerca el proyecto apoyándolo en cada paso.

A mis grandes amigos de siempre: Jair, Enrique, José, Victor Hugo, Judith y Adrián; y a mis nuevos y también muy valiosos amigos: Abraham, Fer, Ernesto, Angélica, Flor, Gus, Joel, ambos Carlos, Lenin, Efrén, Richard, Lety, Hanna y Alex.

A los miembros originales de mi comité tutorial: Dra. Aurea Orozco y Dr. Rogelio Arellano, por sus críticas y jalones de orejas siempre que fueron necesarios.

A mi jurado: Dres: Mauricio Díaz, Rogelio Arellano, Manuel Aguilar, y Gabriel del Río, por su apoyo y valiosas sugerencias y comentarios que enriquecieron este proyecto.

A Irma, nuestra técnica académica, que siempre estuvo al pié del cañón, asesorándome con gran paciencia a lo largo de todo el proyecto.

A los servicios de la Unidad de Proteogenómica, así como de Cómputo, Videoconferencia, y Biblioteca del Instituto.

A toda la unidad administrativa y de enseñanza, y un agradecimiento muy especial a Leo, que siempre estuvo al pendiente de nosotros.

Y por último mi más sincero agradecimiento a CONACYT, y a la máxima casa de estudios de este país: nuestra Universidad Nacional Autónoma de México, que me permitió y aún me permite llevar a cabo mi sueño y desarrollo profesional.

## INDICE

RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
CARACTERÍSTICAS DE LOS CANALES IÓNICOS ABIERTOS POR LIGANDO .....	11
TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LOS CANALES IÓNICOS .....	12
NEUROTRANSMISORES QUE ACTIVAN CANALES IÓNICOS: EL PAPEL DE GABA .....	14
GABA <sub>C</sub> : ESTRUCTURA DEL CANAL HOMOMÉRICO GABA $\rho 1$ .....	19
HIPÓTESIS .....	21
OBJETIVOS GENERALES .....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
MATERIAL Y MÉTODOS .....	22
RESULTADOS .....	36
DISCUSIÓN .....	45
CONCLUSIONES .....	52
BIBLIOGRAFÍA .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Fig 1. Mecanismos de apertura de distintos canales iónicos .....</i>	<i>10</i>
<i>Fig 2. Técnica de fijación de voltaje en ovocitos de Xenopus laevis .....</i>	<i>14</i>
<i>Fig 3. Biosíntesis de GABA a partir de ácido glutámico .....</i>	<i>15</i>
<i>Fig 4. Representación longitudinal de un receptor pentamérico en la membrana .....</i>	<i>15</i>
<i>Fig 5. Representación pentamérica del neuroreceptor GABA<sub>A</sub> .....</i>	<i>16</i>
<i>Fig 6. Corrientes producidas por GABA en ovocitos de Xenopus laevis .....</i>	<i>17</i>
<i>Fig 7. Agonistas y antagonistas específicos de GABA<sub>C</sub> .....</i>	<i>18</i>
<i>Fig 8. Representación estructural del TM2 del receptor homomérico GABA <math>\rho 1</math> .....</i>	<i>20</i>
<i>Fig 9. Mapa funcional del plásmido pGEM.T Easy ® (Promega ®) .....</i>	<i>24</i>
<i>Fig 10. Estrategia de subclonación .....</i>	<i>27</i>
<i>Fig 11. Mapa funcional del plásmido pBluescript II KS (+/-) ® (Stratgene ®) .....</i>	<i>29</i>
<i>Fig 12. Mapa de restricción y funcional del plásmido pCDNA3 ® (Invitrogen ®) .....</i>	<i>30</i>
<i>Fig 13. Amplificación de los extremos 5' y 3' de <math>\rho 1</math> .....</i>	<i>35</i>
<i>Fig 14. Caracterización enzimática en pGEM-T easy ® (Eco RI) .....</i>	<i>36</i>
<i>Fig 15. Caracterización enzimática en pGEM-T easy ® (BamHI-ScaI, ScaI-XhoI) .....</i>	<i>37</i>
<i>Fig 16. Subclonación y caracterización enzimática en pBSKS ® (ScaI) .....</i>	<i>38</i>
<i>Fig 17. Subclonación y caracterización enzimática en pCDNA3 ® (Hind III) .....</i>	<i>39</i>
<i>Fig 18. Alineamiento de secuencias mutantes, y nativa, usando ClustalW .....</i>	<i>39</i>
<i>Fig 19. Electroforetogramas de las secuencias mutantes, Chromas Lite ® .....</i>	<i>40</i>
<i>Fig 20. "Western Blot" .....</i>	<i>40</i>
<i>Fig 21. Transcripción in Vitro .....</i>	<i>40</i>
<i>Fig 22. Respuestas electrofisiológicas en ovocitos .....</i>	<i>41</i>
<i>Fig 23. Curvas dosis respuesta .....</i>	<i>43</i>
<i>Fig 24. Curvas corriente voltaje .....</i>	<i>44</i>
<i>Fig 25. Curva dosis respuesta en heterómeros L316E + <math>\rho 1</math> .....</i>	<i>45</i>
<i>Fig 26. Representación de las modificaciones estructurales .....</i>	<i>46</i>

## ABREVIATURAS

**5HT<sub>3A</sub>**, receptor serotoninérgico tipo 3<sup>a</sup>

**Å**, Angstroms

**AChRs**, receptores de acetilcolina

**Amp**, amplificador

**AmpR**, gen de resistencia a ampicilina

**BCIP/NBT**, 4-metilumbeliferol/nitroazul de tetrazolio

**CACA**, ácido cis-4-aminocrotónico

**Ctrl**, control

**DEPC**, dietilpirocarbonato

**DH5 $\alpha$** , cepa de E. coli

**DNA**, ácido desoxirribonucleico

**DNAc**, DNA complementario

**dNTPs**, desoxinucleótidos trifosfatados

**EDTA**, ácido etilendiaminotetraacético

**F1 ori**, origen de replicación del fago F1

**GABA**, ácido  $\gamma$  aminobutírico

**GABA<sub>A</sub>**, receptor GABA tipo A

**GABA<sub>B</sub>**, receptor GABA tipo B

**GABA<sub>C</sub>**, receptor GABA tipo C

**GAD**, glutamato descarboxilasa

**HEPES**, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazimetanosulfónico

**IPTG**, isopropil  $\beta$ -D-1-trigalactopiranosido

**I-V**, relación corriente vs voltaje

**kan/neoR**, gen de resistencia a kanamicina/neomicina

**LacO**, operón para el transporte y metabolismo de lactosa en E. coli

**LacZ**, gen que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa

**LB**, medio para cultivo bacteriano (Luria Bertani)

**LGIC**, superfamilia de canales iónicos abiertos por ligando

**M13 fwd**, promotor del bacteriófago filamentoso M13

**M13 rev**, promotor antisentido del bacteriófago M13

**nH**, coeficiente de Hill

**pBluescript**, vector fagémido utilizado en clonación molecular

**pCDNA3**, plásmido utilizado como vector de expresión en sistemas heterólogos

**PCR**, reacción en cadena de la polimerasa

**pGEM.T Easy**, vector plasmídico usado para la clonación de productos de PCR

**Pol**, polimerasa

**RNA**, ácido ribonucleico

**RNA<sub>m</sub>**, RNA mensajero

**SCAM**, técnica de acceso de cisteínas por sustitución

**SDS**, lauril sulfato de sodio

**SEVAG**, solución de cloroformo/alcohol isoamílico

**SNC**, sistema nervioso central

**SP6**, promotor de la RNA polimerasa del fago SP6

**T4**, bacteriófago T4 y por antonomasia promotor del mismo

**T7**, promotor del bacteriófago T7

**TAQ**, polimerasa termoestable (*Thermophilus aquaticus*)

**TBS**, solución amortiguadora de tris

**TE**, amortiguador tris-EDTA

**TM2**, segmento transmembranal 2

**TPMPA**, ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridina-4-il metil fosfonico

**V<sub>com</sub>**, voltaje sostenido (controlado por computadora)

**V<sub>m</sub>**, voltaje de membrana

**WT**, nativo o silvestre

**x-Gal**, 5-bromo-4-cloro-3-indol-beta-D-piranósido

**$\rho$  (rho)**, subunidad del receptor GABA tipo C

## RESUMEN

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio cerebral en los vertebrados. Tradicionalmente los neuroreceptores sensibles a GABA han sido clasificados en dos subtipos farmacológica y estructuralmente distintos: los que por sí mismos forman canales iónicos (receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>); y aquellos que están acoplados indirectamente a canales iónicos (GABA<sub>B</sub>). Del primer subtipo, los receptores GABA<sub>C</sub> pueden formar homopentámeros funcionales cuando son expresados en sistemas heterólogos y están integrados por subunidades llamadas  $\rho$ ; estas están constituidas por dominios funcionales, de los que cabe destacar una  $\alpha$  hélice transmembranal que forma el poro del canal. Algunos de los residuos centrales en este dominio son de carácter hidrófobo y se encuentran conservados en otros receptores miembros de esta misma familia. El residuo L9' que forma parte del poro, es uno de los más conservados evolutivamente; para este estudio valoramos su funcionalidad en el neuroreceptor humano GABA<sub>C</sub>  $\rho$ 1. Realizamos mutaciones puntuales generando así dos cambios llamados L9'E, y L9'I. El efecto de las mutaciones sobre la función del receptor se evaluó mediante técnicas electrofisiológicas utilizando como modelo de expresión el ovocito de *Xenopus laevis*. Los receptores mutantes no fueron funcionales cuando se inyectaron independientemente; sin embargo al coexpresar las subunidades mutantes con subunidades  $\rho$ 1 silvestres encontramos algunos cambios significativos, específicamente en el caso del heterómero L9'E  $\rho$ 1 silvestre, en que las bajas concentraciones de GABA ( $1 \times 10^{-7}$  M) generaron una corriente saliente, no obstante el ión permeante en estos receptores es Cl<sup>-</sup> de acuerdo a lo predicho por la ecuación de Nernst, y semejante a lo que ocurre en el receptor  $\rho$ 1. Considerando todo lo anterior, sugerimos que este residuo es muy importante para controlar la funcionalidad del flujo iónico del receptor.

## ABSTRACT

The  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the brain of vertebrates. Traditionally the GABA sensitive neuroreceptors had been classified in two pharmacologic and structural subtypes: those that by themselves form ionic channels (GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub>); and those coupled to ionic channels indirectly (GABA<sub>B</sub>). GABA<sub>C</sub> receptors form functional homopentamers when expressed in heterologous systems and are assembled by  $\rho$  subunits. They are constituted by functional domains of which a transmembrane  $\alpha$  helix is lining the ion-channel. Some of the residues of this domain are hydrophobic and conserved in other receptors that belong to the same family. The L9' residue which lines the pore is evolutionarily conserved. This work deals with the functional properties conferred by this residue in the human neuroreceptor GABA<sub>C</sub>  $\rho$ 1. We generated single-site mutants giving rise to two substitutions (L9'E, and L9'I). The effects on the receptor were evaluated by electrophysiology in *Xenopus laevis* oocytes. The mutant receptors were non-functional when injected independently; nevertheless co-expressing the mutant subunits together with  $\rho$ 1 wild-type significant changes were observed. Specifically, heteromeric L9'E +  $\rho$ 1 wild type, where GABA ( $1 \times 10^{-7}$  M) generated an outward current. Interestingly, the permeating ion in these receptors is Cl<sup>-</sup>, in agreement with the Nernst equation, and similar to what occurs in  $\rho$ 1. Taking all together, we suggest this residue is very important to control the function of the receptor ion-pathway.



## INTRODUCCIÓN

Cuando hablamos de un receptor podemos pensar en conceptos muy distintos. Esta disimilitud surge porque existe una gran cantidad de significados asociados con esta palabra. Existen distintos tipos de receptores; por ejemplo, sólo en fisiología existen receptores de temperatura, de presión, cinestésicos, gustativos, de hormonas, de luz, musculares, olfatorios, entre otros (Guyton y Hall, 1997).

En Biología Celular, un receptor es descrito como: una organización molecular con distinto grado de complejidad, localizada en la membrana o en el interior de la célula, cuya interacción con entidades fisiológicas variadas (neurotransmisores, hormonas, toxinas, opiáceos, medicamentos, etc.) inicia los mecanismos celulares de respuesta correspondientes. A dicha molécula capaz de unirse con cierta especificidad a un receptor se le llama ligando (Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 1996).

Es común encontrar múltiples receptores para un mismo ligando. Por tanto, diferentes subtipos de un receptor para cierto ligando permiten una diversidad de respuesta a las células que expresan los subtipos del receptor. Por ejemplo, un ligando puede causar la apertura de un canal iónico a través de un subtipo de receptor y causar cambios en el metabolismo celular a través de otro subtipo (Aidley y Stanfield, 1996). La unión de un ligando a su receptor inicia una cascada de eventos que puede ser tan simple como causar un flujo iónico, o tan complejo como modular la transcripción de ciertos genes (Alberts et al., 2002).

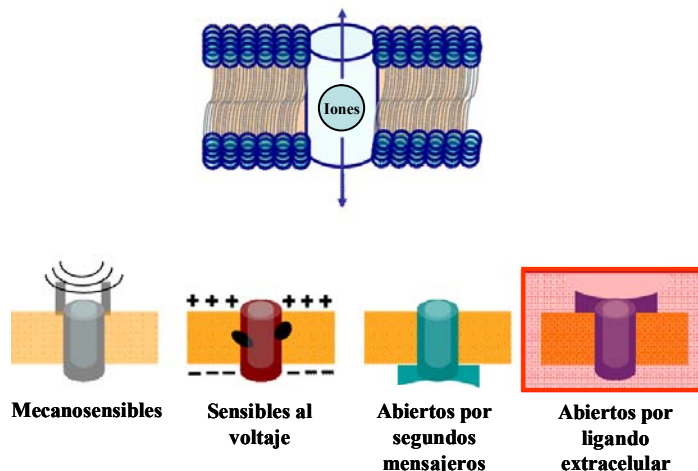
Los receptores pueden ser agrupados en seis familias principales: receptores ionotrópicos, receptores de tirosinas cinasas, receptores de citocinas, receptores acoplados a proteínas G, receptores de unión al DNA, y receptores de adhesión. Cada uno de estos receptores tiene un papel fisiológico distinto, sin embargo para los fines de este proyecto se examinarán solamente los receptores ionotrópicos (Aidley y Stanfield, 1996).

La familia de receptores ionotrópicos es aparentemente simple, ya que existen sólo seis miembros conocidos con ligandos relativamente básicos. Sin embargo, la complejidad puede observarse en estudios a mayor precisión. La

necesidad por este mayor grado de complejidad se puede entender dado que la familia es responsable de la mayor parte de entradas excitadoras e inhibitoras rápidas en el sistema nervioso central (Morel, 1997).

Los receptores ionotrópicos forman pues “canales iónicos”, estos últimos son moléculas que generan poros acuosos, los cuales pueden abrirse y cerrarse para permitir el flujo de iones a través de las membranas celulares. La mayor parte de las células animales están en contacto con soluciones moderadamente salinas, tales como el agua de mar ó los fluidos corporales. Estas soluciones extracelulares contienen usualmente una concentración relativamente alta de sodio y de iones cloro, y mucho menores concentraciones de potasio, calcio y otros iones. Existe una diferencia de potencial entre el citoplasma y el medio externo. Esto combinado con los gradientes iónicos de concentración genera un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática para cada especie iónica. Las células hacen un uso considerable de estos gradientes electroquímicos en sus sistemas de control y señalización, cuando los canales iónicos apropiados se abren, los iones fluyen bajo los gradientes dentro o fuera de la célula (Aidley, 1998). Un canal iónico se compone usualmente de unas cuantas moléculas proteicas, en ocasiones de sólo una. Además contiene un poro acuoso central que puede ser abierto mediante un cambio conformacional que permite a los iones fluir de un lado de la membrana a otro. Esta modificación permite a los iones circular a través del canal a tasas aproximadas de cien millones de iones por segundo cuando este último se encuentra abierto (Mathews y Van Holde, 1998).

Los canales iónicos varían considerablemente en sus mecanismos de apertura, o dicho de otra manera en los factores que los hacen abrir o cerrar. Algunos canales son abiertos por agentes químicos encontrados en el interior o exterior de las células, tal es el caso de los neurotransmisores y las moléculas mensajeras citoplasmáticas. Otros son abiertos por cambios en el voltaje a través de la membrana y aún otros por estímulos sensoriales de varios tipos (Alberts et al., 2002), **fig. 1**.



**Fig. 1. Mecanismos de apertura de distintos canales iónicos.**

Existen distintos factores que permiten la apertura de los canales iónicos: estímulos mecánicos, cambios en el voltaje de la membrana, o incluso la unión de ligandos intra o extracelulares; resaltando a éstos últimos por el enfoque particular del proyecto (adaptado de Alberts et al., 2002).

Los canales iónicos tienen también cierta selectividad, es decir, sólo permiten el paso de algunos iones, de acuerdo con sus características estéricas y electrostáticas. Esto significa que iones específicos tales como sodio, potasio, calcio y cloro serán diferenciados, siendo capaces de permear por un tipo particular de canal sólo los de una especie electrostática o de acuerdo también al tamaño de partícula del ión en cuestión; otros canales son menos selectivos y permiten el paso a varios grupos iónicos, tal es el caso los cationes monovalentes, o cationes en general (Hebert, 1998).

Estos dos aspectos importantes para la actividad de los canales iónicos, la **apertura** y la **selectividad**, son conceptualmente distintos el uno del otro. Los estudios de estructura molecular confirman esta perspectiva: las partes moleculares del canal que corresponden a la apertura parecen estar separadas de las que atañen a la selectividad, tanto estructural como funcionalmente (Aidley y Stanfield, 1996).

## CARACTERÍSTICAS DE LOS CANALES IONICOS ABIERTOS POR LIGANDO

Todos los canales iónicos abiertos por ligandos conocidos están formados por subunidades homólogas. En las últimas dos décadas se han identificado un gran número de genes que codifican estas subunidades; muchas de ellas derivan posiblemente de un ancestro común (Ortells y Lunt, 1995; Methot et al., 2001).

La variabilidad en la secuencia aminoacídica de estas subunidades homólogas genera diferencias en las propiedades de permeabilidad y en las afinidades que tiene el ligando por el receptor. Además, estas variaciones afectan también la cinética entre los diferentes estados estructurales, es decir las transiciones alostéricas, dando como consecuencia un rango de variación en el tiempo de apertura del canal así como en sus propiedades electrodinámicas (Martin y Olsen, 2000).

Uno de los nichos celulares más importantes para los receptores ionotrópicos son las neuronas. La comunicación entre estas células es llamada neurotransmisión, e implica generalmente la liberación de un mensajero químico, el **neurotransmisor**, que actúa como ligando al ser liberado por la célula presináptica, para posteriormente unirse a receptores de la célula postsináptica (Mathews y Van Holde, 1998).

Los receptores ionotrópicos neuronales generan respuestas sinápticas rápidas ante distintos neurotransmisores en la sinapsis. Por ejemplo: la transmisión en la unión neuromuscular de los vertebrados es mediada por canales abiertos por **acetilcolina**; la transmisión excitatoria en las motoneuronas espinales es mediada por canales abiertos por **glutamato**, y la transmisión inhibitoria en estas mismas neuronas es mediada por canales abiertos por **glicina** o **GABA** (Martin y Olsen, 2000).

Algunas células nerviosas pueden usar más del 50% de su gasto energético en establecer y mantener gradientes químicos de iones a través de sus membranas celulares, éstos pueden fluir pasivamente a través de los canales bajo sus

respectivos gradientes químicos. Los iones siendo solutos eléctricamente cargados son dirigidos a través de los canales mediante un campo eléctrico. La energía química almacenada como gradientes iónicos forma una batería, y los iones utilizan esta batería química para generar un flujo de corriente eléctrica a través de los canales de acuerdo con la ley de Ohm:

$$I = G * V$$

Donde I (en Amperios) representa a la corriente eléctrica; G (en Siemens) a la conductancia o la facilidad con la cual los iones se mueven por los canales a través de la membrana; y V (en Voltios) a la fuerza electromotriz generada por la batería química formada de gradientes iónicos. Por otra parte, los canales no son poros estáticos. La apertura periódica generada por cambios conformacionales permite que el canal se abra y se cierre; igual que un interruptor puede apagar o encender repetitivamente la luz generada por un foco incandescente. También el mecanismo de apertura repentina de un canal produce un estallido de corriente de unos pocos picoAmperios (pA) (Hebert, 1998).

## TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LOS CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos pueden ser medidos utilizando una variedad de técnicas tanto desde su enfoque fisiológico como desde sus aspectos biofísicos. Algunas de estas técnicas son:

- Trazadores radiactivos de flujo unidireccional
- Empalamiento intracelular con microelectrodos elaborados con pipetas muy finas
- Registro con microelectrodos de “patch clamp” para una célula completa
- Registro con microelectrodos de “patch clamp” para una parte separada de la membrana celular
- Incorporación de canales en bicapas lipídicas artificiales

Todas las técnicas anteriores son usualmente combinadas con técnicas de Biología Molecular. El orden en que se presentan estas técnicas es dado por las características propias del canal, y por ello confieren cierta facilidad de manejo bioquímico adecuado para el canal proteico que se estudia; sin embargo, una consecuencia inevitable de todas estas técnicas es que disminuye la realidad fisiológica en el ambiente del canal. La selección de una técnica en particular depende de la pregunta específica que se pretende contestar (Tester, 1997).

A las técnicas nombradas anteriormente se adiciona una técnica central, que es conocida como **control de voltaje**, (“voltage clamp”). En ella se utiliza un amplificador de retroalimentación, se inyecta corriente en el circuito constituido por la membrana celular para fijar el voltaje a través de la membrana a un nivel específico, y la corriente requerida para fijar el voltaje es registrada. Cuando cambia el voltaje, la corriente requerida para fijar el voltaje cambia proporcionalmente. Esto se consigue teniendo un par de electrodos, uno que mide el potencial de la membrana, y otro que mide el paso de la corriente. La corriente es registrada mediante un par de electrodos muy pequeños, ajustados a las características de la célula y constituidos por finos alambres de plata o platino cubiertos por una capa de cloruro de plata y contenidos en capilares de vidrio adelgazados hacia la punta con un diámetro aproximado de 0.5  $\mu$ m. La micropipeta es llenada con una solución electrolítica de KCl 3 M. Este tipo de electrodos tiene una alta resistencia, que va de cinco a varios cientos de megaohms ( $M\Omega$ ) (Ward, 1997).

Hace aproximadamente dos décadas se descubrió que la inyección de RNA mensajero aislado del órgano eléctrico del pez *Torpedo* en ovocitos de *Xenopus laevis* lleva a la expresión de receptores de acetilcolina funcionales (AChRs) en la membrana plasmática del ovocito (Barnard et al., 1982). Con este procedimiento el ovocito traduce el RNA mensajero heterólogo, procesa los productos polipeptídicos, y los incorpora en su membrana plasmática en donde forma proteínas funcionales. El tamaño del ovocito ofrece una gran flexibilidad experimental pues permite utilizar diversas metodologías para el estudio de canales iónicos. Esto facilita el estudio de su funcionalidad, pues se registra la

actividad eléctrica de toda la célula, generada precisamente por la incorporación de receptores ionotrópicos en su membrana. Con el desarrollo de técnicas en Biología Molecular como son la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), o la síntesis *in vitro* de RNA, se utiliza cada vez más al ovocito como sistema de expresión en diversos estudios electrofisiológicos de canales iónicos clonados a partir de distintos organismos, entre ellos el mismo ser humano (Miledi et al., 1982), **fig. 2**.

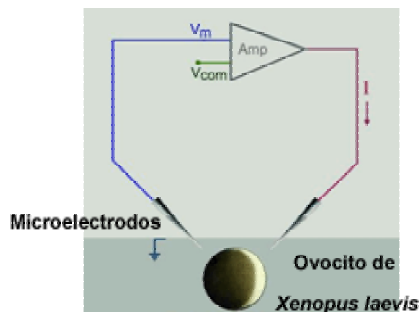
**Fig. 2. Técnica de “Voltage Clamp” en ovocitos de *Xenopus laevis*.**

Uno de los microelectrodos registra el potencial de membrana, mientras que el otro detecta un cambio en el potencial, es decir el paso de la corriente dado cada vez que los canales iónicos se abren por la unión del ligando a su receptor.

**V<sub>m</sub>** = Voltaje de membrana

**V<sub>com</sub>** = Voltaje controlado por computadora

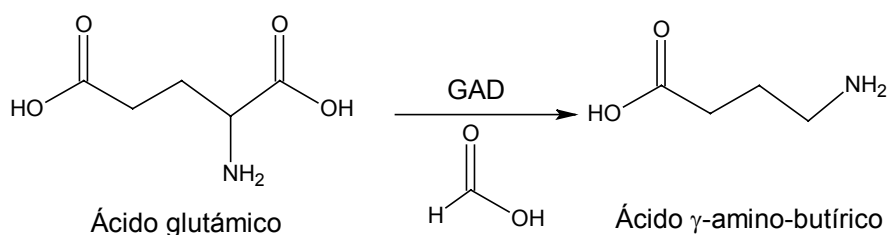
**Amp** = Amplificador



## NEUROTRANSMISORES QUE ACTIVAN CANALES IÓNICOS: EL PAPEL DE GABA

Existen diferentes tipos de neurotransmisores los cuales tienen naturaleza química distinta. Los canales iónicos que se abren directamente en respuesta a los neurotransmisores: acetilcolina, serotonina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), y glicina, contienen subunidades que son estructuralmente similares, sugiriendo que estos receptores están relacionados evolutivamente aunque su especificidad de unión por un neurotransmisor y su selectividad iónica sean distintas. Los canales iónicos abiertos directamente en respuesta a acetilcolina y serotonina permiten el paso de cationes de un lado a otro de la membrana celular; mientras que los de GABA y glicina, de manera inversa, permean al paso de aniones (Hebert, 1998; Unwin et al., 2002; Connolly y Wafford, 2004).

El hallazgo de GABA en el cerebro de vertebrados en el año de 1950 fue el primer paso de una gran serie de descubrimientos. GABA es el neurotransmisor inhibitorio más importante en el SNC de vertebrados, es producido por la descarboxilación de glutamato mediante las enzimas glutamato descarboxilasas (GADs **fig. 3**) (Martin y Olsen, 2000).



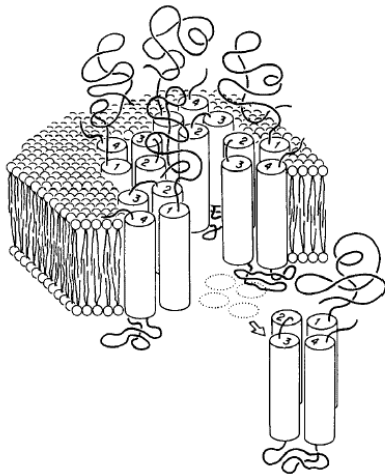
**Fig 3. Biosíntesis de GABA a partir de Ácido glutámico.**

Tradicionalmente los neuroreceptores sensibles a GABA han sido clasificados en dos subtipos farmacológica y estructuralmente distintos: GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. Se descubrió inicialmente que GABA activa canales de Cl<sup>-</sup> sensibles a bicuculina, y poco después se determinó que GABA también media la activación



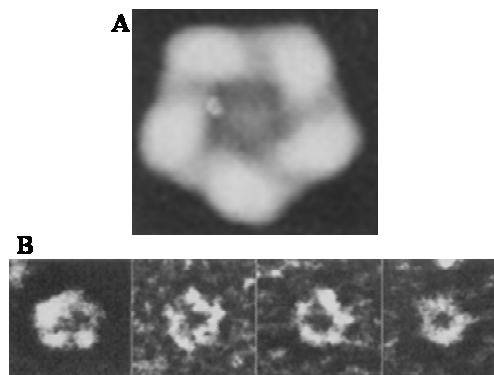
de canales catiónicos, esto llevó a conjeturar la existencia de dos receptores distintos: el subtipo GABA<sub>A</sub>, y por otra parte el subtipo GABA<sub>B</sub> (Enz, 2001).

El receptor GABA<sub>A</sub> conforma a un receptor ionotrópico, el cual puede ensamblarse por la combinación de varias subunidades:  $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon/x$  y  $\theta$  (Whiting et al., 1999). Estas subunidades contienen un dominio extracelular N-terminal y cuatro regiones o segmentos transmembranales. Se piensa que las subunidades se coensamblan formando un pentámero (Borman, 2000), (**fig. 4**).



**Fig. 4. Representación en perspectiva de un receptor pentamérico insertado en la membrana.** Cada una de sus subunidades está formada por cuatro segmentos transmembranales (Macdonald & Olsen, 1994).

Otros datos que apoyan la teoría del pentámero son aportados por micrografías electrónicas de receptores extraídos mediante cromatografía de afinidad de corteza cerebral de cerdo (Nayeem et al., 1994) **fig. 5**.



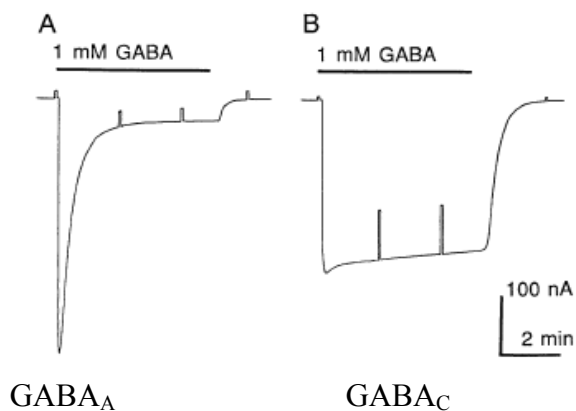
**Fig. 5. Representación pentamérica del neuroreceptor GABA<sub>A</sub>.**

**A**, Imagen generada a partir de la media estadística de varias micrografías electrónicas. **B**, Cuatro partículas de receptor típicas encontradas en campos aumentados 33000x. (Nayeem et al., 1994).

Los receptores GABA<sub>B</sub> son miembros de la familia de receptores de siete segmentos transmembranales. Están acoplados ya sea a canales de K<sup>+</sup> o Ca<sup>2+</sup> a través de proteínas G y son regulados por sistemas de segundos mensajeros intracelulares. Son activados selectivamente por baclofeno y no responden a los moduladores conocidos de GABA<sub>A</sub> (Ogata, 1990).

Recientemente se descubrió un tercer tipo de receptor sensible a GABA llamado GABA<sub>C</sub>, el cual tiene varias características similares a las del receptor GABA<sub>A</sub> ya conocido (Polenzani et al., 1991). Los receptores GABA<sub>C</sub> están conformados por subunidades denominadas  $\rho$ . GABA<sub>C</sub> puede generarse a partir del coensamble de homooligómeros ( $\rho$ 1,  $\rho$ 2,  $\rho$ 3). Se ha propuesto que tres moléculas de GABA son necesarias para abrir el canal, mientras que dos sitios de unión adicionales incrementan la sensibilidad al ligando y estabilizan el estado abierto del receptor (Amin y Weiss, 1996; Enz y Cutting, 1998). El segundo segmento transmembranal forma el canal del receptor GABA<sub>C</sub>; éste comparte más similitud en su secuencia aminoacídica con las subunidades  $\alpha$  del receptor de glicina que con cualquiera de las subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub> (Enz, 2001).

Una de las características fisiológicas más importantes que distingue a los receptores GABA<sub>C</sub> es el tiempo que permanecen abiertos en respuesta al neurotransmisor. Mientras que los receptores GABA<sub>A</sub> poco a poco se van cerrando aún estando expuestos al ligando, los receptores GABA<sub>C</sub> no lo hacen, es decir permanecen abiertos todo ese tiempo y por ello se dice que **no se desensibilizan** (Polenzani et al., 1991; Woodward et al., 1992, 1993, 1994), **fig. 6**.

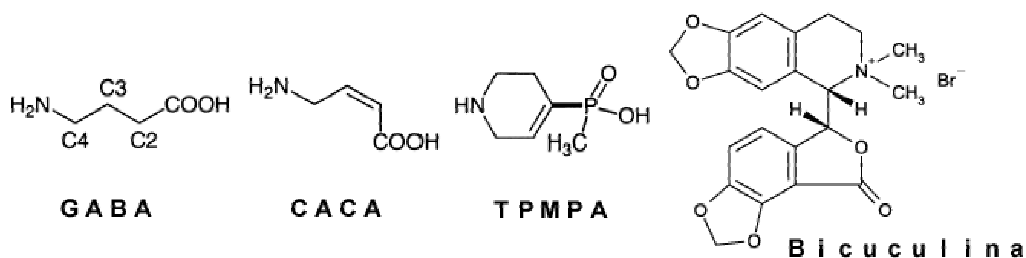


**Fig 6. Corrientes producidas por GABA en ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con RNAm de corteza cerebral y retina.**

**A**, Corriente típica de receptores GABA de la corteza cerebral (mayoritariamente GABA<sub>A</sub>).

**B**, Corriente típica de receptores GABA en la retina (mayoritariamente GABA<sub>C</sub>) (Polenzani et al., 2001).

Estudios con subunidades GABA<sub>C</sub>  $\rho_1$  humanas expresadas en ovocitos determinaron que los receptores GABA<sub>C</sub> son cuarenta veces más sensibles a GABA, se activan ocho veces más lentamente, no se desensibilizan con una aplicación sostenida del agonista por varios minutos, y se inactivan cerca de ocho veces más lentamente después de la eliminación del agonista con respecto a los receptores GABA formados por subunidades  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  (Johnston, 1996). Uno de los agonistas selectivos del receptor GABA<sub>C</sub> es el ácido cis-4-aminocrotónico (CACA) (Feigenspan et al., 1993). Por otra parte, los receptores GABA<sub>C</sub> son inhibidos específicamente por el TPMPA (Ragozzino et al., 1996). A diferencia de los receptores GABA<sub>A</sub>, los GABA<sub>C</sub> son insensibles a la bicuculina y no son modulados por anestésicos volátiles como los barbitúricos (Enz, 2001), **fig 7**.



**Fig 7. Agonistas y antagonistas específicos de GABA<sub>C</sub>**

Una característica destacable de los canales iónicos abiertos por GABA es su coeficiente de activación ( $n_H$ ), el cual indica el grado o magnitud de cooperatividad dado por los sitios de unión, ante la unión del ligando con su receptor, es decir, si aumenta, disminuye o es inalterada la afinidad por el ligando una vez que se une una molécula de GABA al receptor. Éste coeficiente es de  $\sim 2$  tanto para el receptor GABA<sub>A</sub> como para el GABA<sub>C</sub>, lo cual significa que ambas proteínas son alostéricas y ambas tienen también el mismo grado de cooperatividad. Por otra parte, mediante estudios de “patch clamp” se obtuvo la conductancia del canal unitario el cual fue de 7.9 pS para el receptor GABA<sub>C</sub> y 29.6 pS para el GABA<sub>A</sub>, este último casi cuatro veces mayor (Feigenspam y Borman, 1994; Zhang et al., 1995).

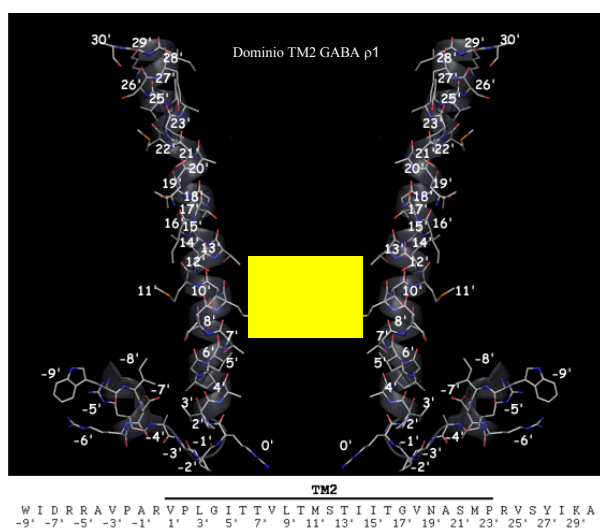
## GABA<sub>C</sub>: ESTRUCTURA DEL CANAL HOMOMÉRICO GABA $\rho$ 1

Hoy en día aún no existen estudios estructurales de alta definición para el receptor GABA  $\rho$ 1, sin embargo evidencia experimental basada en el método de acceso de cisteínas por sustitución (SCAM), sugiere que el segundo segmento transmembranal (TM2) del receptor GABA<sub>A</sub> se coensambla en el centro del pentámero formando el canal. Estos estudios indican que TM2 es una hélice  $\alpha$  (Bera et al, 2002). SCAM es una técnica muy poderosa; consiste en realizar mutaciones sitio-dirigidas cambiando un aminoácido determinado por una cisteína, la cual tiene un grupo sulfhidrilo que a su vez reacciona con reactivos específicos. Se ha determinado que existen subdominios dentro de la región TM2 que controlan la permeabilidad iónica, la localización del filtro de selectividad (el cual regula la unión del ión específico).

También por SCAM se comprobó que de los 26 residuos que conforman y flanquean el segundo segmento transmembranal de GABA<sub>A</sub> ( $\alpha$ 1,  $\gamma$ 1 y  $\beta$ 2), 9 de ellos están expuestos en el lumen. Se asumió que de los residuos que atraviesan la membrana sólo los que se exponen en el lumen se encuentran accesibles para reaccionar con el grupo sulfhidrilo (Xu y Akabas, 1996).

Al retomar el concepto del filtro de selectividad encontramos que en los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>, éste está formado por un segmento de aminoácidos cargados que permiten el paso de un grupo iónico específico. Varias evidencias indican que el filtro de selectividad del receptor GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> se localiza hacia el extremo citoplasmático del poro, puesto que varios reactivos sulfhidrúlicos reaccionan con cisteínas por debajo del nivel de  $\alpha$ 1V257, mientras que los reactivos catiónicos sólo pueden llegar a nivel de  $\alpha$ 1T261 en GABA<sub>A</sub>. De manera simplista esto podría sugerir que el residuo que habilita al receptor GABA para seleccionar aniones en vez de cationes se encuentra por debajo de la posición 261 de la subunidad  $\alpha$  en el receptor GABA<sub>A</sub>. No se sabe aún si el mecanismo de apertura involucra reacomodos de una subregión dentro del poro, o un reacomodo estructural de la vía completa. Con base en la información estructural (9 Å de resolución) de los estados abierto y cerrado de los receptores homólogos de

acetilcolina, una leucina conservada en el punto medio de TM2 estaría implicada en la apertura de los receptores GABA. La mutación de esta leucina conservada en el receptor GABA<sub>A</sub> es, por sí sola, capaz de producir cambios que modifican significativamente a su vez las propiedades funcionales de todo el canal (Chang y Weiss, 1998; Martínez-Torres y Miledi, 2004), **fig. 8**.



**Fig 8. Representación estructural del segundo segmento transmembranal del receptor homomérico GABA  $\rho$ 1.** El modelo fue generado utilizando el programa PyMOL modificando las coordenadas del receptor nicotínico de Acetilcolina (2BG9.pdb).

## JUSTIFICACIÓN

A pesar de conocerse la secuencia que codifica al receptor GABA<sub>C</sub>, aún desconocemos el patrón en que en el que se ensambla formando al receptor ionotrópico en las células en que éste se expresa, así como muchos detalles importantes del proceso de plegamiento de las subunidades  $\rho$ 1 que lo constituyen, a la par de las modificaciones que sufre debido al cambio conformacional una vez activado. Su naturaleza anfótera dificulta su cristalización. Dicha cristalización permitiría conocer a detalle sus características estructurales ultrafinas. La carencia

de métodos eficientes de cristalización de receptores de membrana ionotrópicos limita pues la elaboración de estudios fundamentales, para comprender mejor la relación entre la estructura y la función de esta familia de receptores. Es necesaria una aproximación experimental distinta, por ejemplo donde se analice el impacto de mutaciones puntuales sobre aminoácidos clave, que permitan conocer las propiedades de los receptores para entender sus mecanismos moleculares, como las que rigen la actividad del receptor GABA<sub>C</sub>. Particularmente nos interesa el papel de la leucina 316 del receptor GABA<sub>C</sub>  $\rho$ 1, la cual se encuentra altamente conservada en la familia de receptores LGIC. De acuerdo con estudios previos, esta leucina forma la compuerta (en el estado cerrado del receptor), y por tanto controla el paso de los iones a través de la célula en los receptores de acetilcolina, serotonina y GABA<sub>A</sub> (Revah et al., 1991; Yakel et al., 1993; Filatov y White, 1995; Chang et al., 1996). Utilizamos para este estudio dos cambios específicos, uno pequeño (L9'I) el cual no debería modificar significativamente su funcionalidad, y otro grande (L9'E), que en contraparte debería modificarla en gran medida.

## HIPÓTESIS

Distintas mutaciones en el residuo 316 (L9' en la nomenclatura de los LGICs) (L316E, y L316I), localizadas en el segundo segmento transmembranal de la subunidad  $\rho$ 1 del receptor homomérico GABA<sub>C</sub>, inducen cambios estructurales y funcionales importantes en las propiedades de este receptor, tales cambios deben ser concordantes con los que ocurrirían al modificar la estructura de la compuerta de dicho receptor.

## OBJETIVOS GENERALES

Evaluar el efecto de mutaciones puntuales en el residuo L316 (L9') localizado en el segundo segmento transmembranal del receptor homomérico GABA<sub>C</sub> ( $\rho$ 1), analizando sus propiedades funcionales.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generación de mutantes puntuales (que conduzcan a cambios en el aminoácido 316 correspondiente a L9' en la familia de LGIC) L316E, y L316I
2. Expresión de los mutantes en sistemas de expresión heteróloga (ovocitos de la rana *Xenopus laevis*)
3. Caracterización funcional de cada receptor GABA<sub>C</sub> mutante en ovocitos, utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos, realizando relaciones corriente vs voltaje y curvas dosis-respuesta.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los métodos a continuación mencionados se basan en protocolos previamente descritos (Sambrook y Russell, 2001), o en los protocolos respectivos de los kits aquí señalados.

### Generación de Mutantes

Para evaluar la funcionalidad del residuo se generaron mutantes puntuales por PCR (mutagénesis sitio-dirigida) utilizando un oligonucleótido mutagénico correspondiente a un fragmento del segundo segmento transmembranal, en la vecindad del codón que codifica la leucina 316 (L9'). Las secuencias de estos "primers" fueron: 5'-**AGTACT** CATGGT**CTCC**ACCGTTGTGATACCTAA-3', y 5'-**AGTACT** CATGGT**TATC**ACCGTTGTGATACCTAA-3', los cuales cambian el residuo L316 por E (E316) é I (I316), respectivamente. Además de esto, se introdujo en la secuencia un sitio que es reconocido por la enzima *Sca* I. Se utilizó un termociclador de la marca Flexigene ® Modelo FFG02HSD en el cual se diseñó un programa que comprendía las siguientes condiciones:

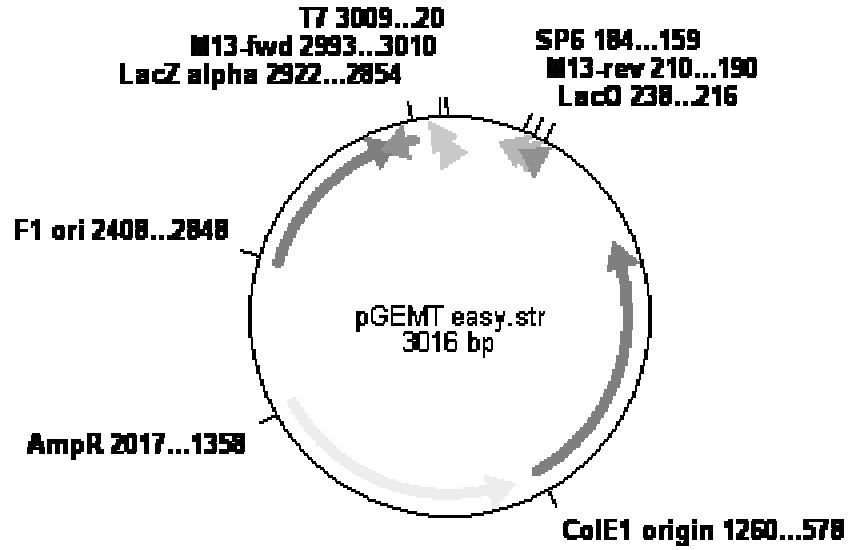


<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
94° C	15 seg
50° C	15 seg
72° C	1' 10 seg

Por 30 Ciclos. Mezcla de reacción:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Amortiguador para PCR 5x	5 µl
MgCl <sub>2</sub> , 50 mM	3.5 µl
Oligonucleótido 5', 2.5 µM	4 µl
Oligonucleótido 3', 2.5 µM	4 µl
dNTPs, 1 mM	1 µl
DNAc rho1, 1 ng/µl	1 µl
TAQ DNA Pol, 5 U/µl	0.5 µl
H <sub>2</sub> O	31 µl

El producto de PCR generó un fragmento que comprende del extremo 5' hasta la primera mitad del segundo segmento transmembranal de ρ1. Posteriormente se procedió a insertar el fragmento amplificado en el vector plasmídico pGEM.T Easy ® (Promega ®), **fig 9**.



**Fig. 9. Mapa funcional del plásmido pGEM.T Easy® (Promega®).**

Por otra parte se generó también por PCR un fragmento que comprende de la segunda mitad del segundo segmento transmembranal hasta el extremo 3' de  $\rho$ 1. Este fragmento fue insertado a su vez en un vector plasmídico pGEM.T Easy®.

### Clonación

Para la ligación del fragmento de PCR con el vector pGEM.T Easy® se realizó la siguiente reacción:

Reactivo	Cantidad
Amortiguador de ligación 5x	8 $\mu$ l
T4 ligasa 5 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Vector pGEM.T Easy®	1 $\mu$ l
Inserto (fragmento ó amplicón de PCR)	23 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l

Y se incubó a 16° C toda la noche.

Posteriormente a 25  $\mu$ l de la mezcla de ligación se añadieron 2.5  $\mu$ l de acetato de sodio y 82.5  $\mu$ l de etanol 100% y se centrifugó por 10 min a 13,000 g. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100  $\mu$ l de etanol 70% centrifugándose nuevamente a la misma velocidad. El sobrenadante fue eliminado mediante pipeteo, secado al “Speedvac” y finalmente el plásmido fue resuspendido en 10  $\mu$ l de agua estéril.

### Transformación

Se tomaron 5  $\mu$ l de la suspensión en un tubo Eppendorf® estéril de 1.5 ml. Se añadieron 100  $\mu$ l de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* y se incubó por 30 min en hielo. Se produjo un choque térmico en un termobañero Thermolyne® modelo 17600 a 42° C por 40 seg. Se añadieron 900  $\mu$ l de medio LB (Bacteriotriptona 10 g/L, pH 6.57; extracto de levadura 5 g/L; pH 6.57) y se cultivó durante 2 h a 37° C. 200  $\mu$ l de este cultivo fueron transferidos a una caja Petri con LB-Agar-Ampicilina (50  $\mu$ g/ml) y se añadieron 40  $\mu$ l de X-Gal 20mg/ml y 10  $\mu$ l de 0.1 M IPTG.

### Extracción plasmídica por lisis alcalina

Se recolectaron colonias blancas las cuales se cultivaron en 4 ml de medio LB con 50  $\mu$ g/ml de ampicilina toda la noche a 37°C con agitación vigorosa (300 g). Se centrifugaron 3 ml del cultivo por 2 min a 14,000 g. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 100  $\mu$ l de solución I (Tris-Cl 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, pH 8.0). Se agitó vigorosamente en “vortex” hasta disolver completamente la pastilla y se incubó 5 min en hielo. Se adicionaron 200  $\mu$ l de solución II (0.2 ml NaOH 10 N, 1.0 ml de SDS 10 % y 8.8 ml de agua), se mezcló por inversión y se incubó 5 min en hielo. Se agregaron 150  $\mu$ l de solución III (60 ml de

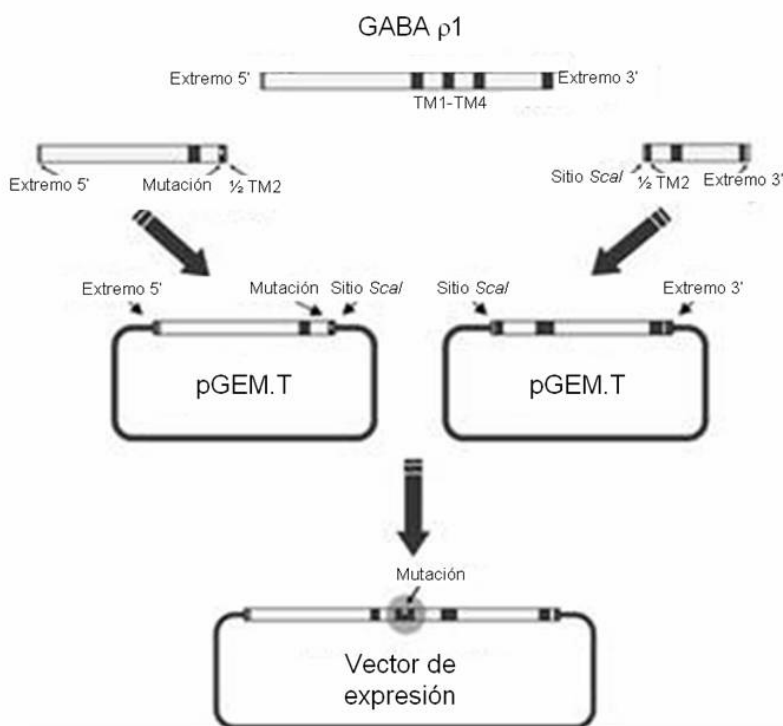
acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético concentrado, 28.5 ml de agua) se mezcló y se incubó 5 min en hielo. Se centrifugó 5 min a 14,000 g y se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se agregó un volumen de fenol saturado con agua MQ estéril y un volumen de solución SEVAG (cloroformo:alcohol isoamílico 29:1). Se mezcló en “vortex” y se centrifugó 5 min a 14,000 g. Se separó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se agregaron dos volúmenes de etanol al 100 % incubando 1 hora a -80° C. Se centrifugó a 14,000 g y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el DNA plasmídico en 30  $\mu$ l de TE y se cortó con enzimas de restricción (*EcoRI* y *ScaI*), las que permitieron caracterizar la identidad del plásmido. Cada mutación generada fue secuenciada de manera automatizada con un aparato ABI PRISM 310  $\text{\textcircled{R}}$  Genetic Analyzer  $\text{\textcircled{R}}$  en la unidad de Biología Molecular del INB UNAM campus Juriquilla.

### Subclonación

Los fragmentos 5' y 3' correspondientes a las dos mitades del DNAC de  $\rho$ 1 fueron extraídas de los vectores pGEM.T Easy  $\text{\textcircled{R}}$  mediante enzimas de restricción, *Bam* HI - *Sca* I para 5'; y *Xho* I - *Sca* I para 3' respectivamente. Los sitios de reconocimiento para estas enzimas fueron introducidos previamente en los “primers” antes de a la generación de cada construcción. Se añade un esquema completo de la estrategia de subclonación en la **fig. 10**.

Mezcla de reacción:

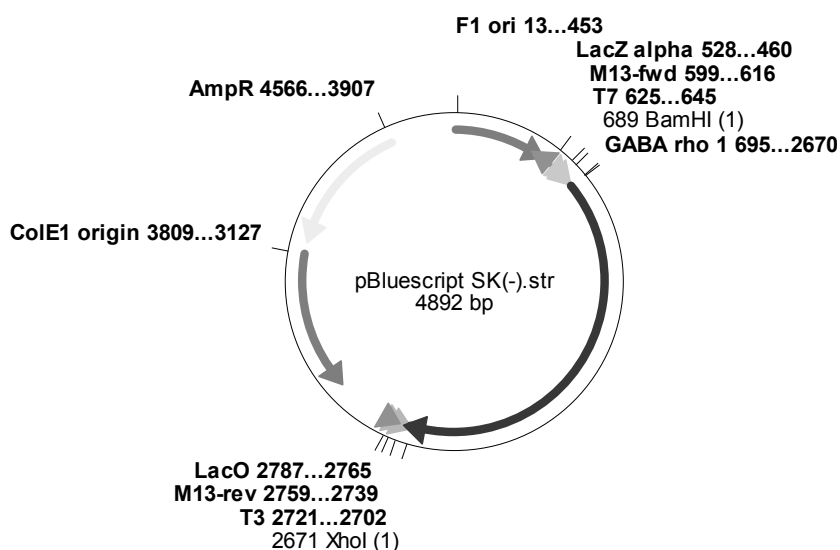
Reactivo	Cantidad
DNA, 0.8 $\mu$ g/ml	6.25 $\mu$ l
Amortiguador 10x	10 $\mu$ l
Mezcla enzimática	3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	80.75 $\mu$ l



**Fig. 10. Estrategia de subclonación.** El gen que codifica para  $\rho$ 1 fue dividido en dos fragmentos amplificados por PCR, el extremo 5', incluía la mutación específica (L9'E ó L9'I). Ambos fragmentos fueron clonados de manera independiente en el vector pGEM.T Easy®, y subclonados posteriormente en un vector de expresión para sistemas heterólogos.

El resultado del corte enzimático fue resuelto en un gel de agarosa al 1 % y las bandas de interés fueron aisladas con una hoja de bisturí. Se pesó la banda aislada en un tubo Eppendorf® de 1.5 ml previamente pesado. Se utilizó un estuche comercial de extracción de Qiagen® del cual se agregaron tres volúmenes de amortiguador QG. Se incubó por 10 min a 50° C hasta ver la disolución de la agarosa. Se agregó un volumen de isopropanol y se mezcló. La solución anterior fue trasladada a una columna la cual se centrifugó a 10000 g durante un minuto. Se eliminó el precipitado y se agregaron 0.5 ml de amortiguador QG. Se centrifugó por un minuto y nuevamente se eliminó el precipitado. Se agregaron

0.75 ml de amortiguador PE y nuevamente se centrifugó a 10000 g por un minuto eliminando el precipitado. Se centrifugó la columna nuevamente por un minuto a 13000 g. Se colocó la columna en un tubo Eppendorf® estéril y se añadieron 30 µl de H<sub>2</sub>O estéril. Se centrifugó a 10000 g por un min. Se tomó 1 µl para resolver en un gel de agarosa al 0.8 % y determinar el éxito de la purificación. Posteriormente se procedió a reconstituir los productos purificados en el vector pBluescript II KS (+/-)® (Stratgene®), **fig. 11**.

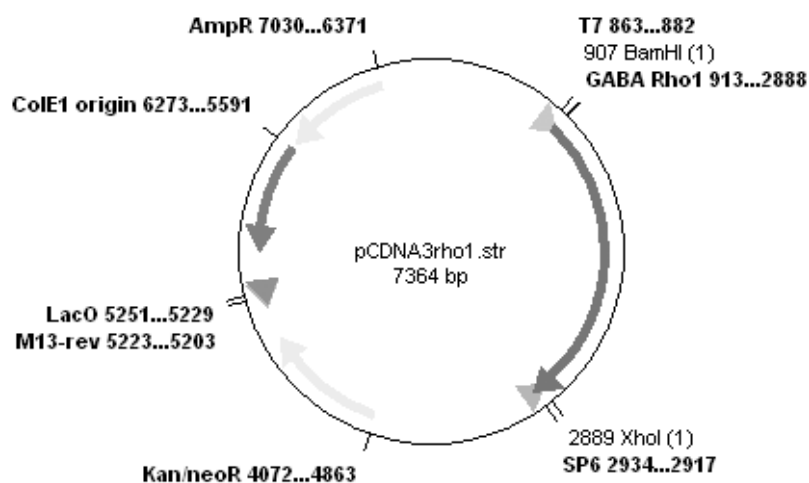


**Fig. 11. Mapa funcional del plásmido pBluescript II KS (+/-)® (Stratgene®)**

Mezcla de reacción:

Reactivo	Cantidad
Extremo 5´	6 µl
Extremo 3´	5 µl
pBluescript II KS (+/-) (~100 ng/µl)	4 µl
Amortiguador de ligación 5X	4 µl
T4 DNA ligasa 5U/µl	1 µl

Cada reacción de ligación fue utilizada para transformar la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* utilizando el procedimiento previamente descrito. Posteriormente se subclonaron los DNAs de  $\rho$ 1 L316-E y  $\rho$ 1 L316-I en el vector de expresión: pCDNA3 ® (Invitrogen ®), **fig. 12**. Utilizando para ello las enzimas *Bam* HI y *Xho* I.



**Fig. 12. Mapa de restricción y funcional del plásmido pCDNA3 $\rho$ 1, el DNAc de  $\rho$ 1 se encuentra entre los sitios *Bam*HI y *Xho*I**

Mezcla de ligación:

Reactivo	Cantidad
Inserto DNA ( $\rho$ 1 L316-E,I) 1 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ l
pCDNA3 (~100 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l
Amortiguador de ligación 5X	4 $\mu$ l
T4 DNA ligasa 5U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l

El producto fue clonado en *E coli* DH5 $\alpha$  por el procedimiento ya mencionado y los plásmidos cuya identidad fue positiva se purificaron con un kit de Qiagen  $\text{\textcircled{R}}$  de mediana escala. Se cultivaron las cepas en 50 ml de medio LB por 16-18 h a 37°C en agitación (300 g) las cuales se colectaron por centrifugación a 6000 G por 15 min en un tubo Falcon  $\text{\textcircled{R}}$  de 50 ml desechando el sobrenadante y resuspendiendo el botón mediante agitación al “vortex” en 4 ml de amortiguador P1. Se añadieron 4 ml de buffer P2 mezclando por agitación varias veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se añadieron 4 ml de buffer P3 previamente enfriado, mezclando inmediatamente por agitación varias veces y se incubó en hielo por 15 min. Se centrifugó a 10000 g por 30 minutos a 4° C y posteriormente se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo estéril. Se centrifugó nuevamente a 10000 g durante 15 min. Se equilibró una columna por cada muestra haciendo pasar por ella 4 ml de amortiguador QBT y permitiendo que éste se filtrara por gravedad. Una vez equilibrada se pasó el contenido del tubo centrifugado previamente permitiendo que el DNA fuese atrapado en la resina de la columna filtrando por gravedad. Se lavó la columna un par de veces con 10 ml de amortiguador QC. El DNA fue eluído haciendo pasar 5 ml de amortiguador QF por la columna y se almacenó en un tubo nuevo para posteriormente precipitarlo añadiendo 3.5 ml de isopropanol y centrifugado inmediatamente a 10000 g durante 30 minutos a 4° C. Se eliminó con cuidado el sobrenadante y se lavó la pastilla un par de veces con etanol 70 % centrifugando a 10000 g por 10 min. El líquido fue eliminado cuidadosamente con pipeta, secado al vacío y resuspendiendo inmediatamente el DNA en 50  $\mu$ l de agua estéril.

### Transcripción *in Vitro*

Se sintetizó RNAc de los receptores mutantes ( $\rho$ 1 L316-E y  $\rho$ 1 L316-I), y el receptor silvestre ( $\rho$ 1 WT), clonados previamente en pCDNA3  $\text{\textcircled{R}}$ ,



utilizando el kit mMESSAGE mMACHINE  $\text{\textcircled{R}}$  T7 (Ambion  $\text{\textcircled{C}}$ ). Se utilizaron 3  $\mu\text{g}$  cuantificados al espectro del plásmido linearizado con *Xho* I (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), para la reacción de transcripción a la cual se añadió 10  $\mu\text{L}$  T7 2x NTP/ARCA, 2  $\mu\text{L}$  10x amortiguador T7, 2  $\mu\text{L}$  de RNA polimerasa T7, 3  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas. La reacción fue incubada por 2 hrs a 37°C. Este producto de incubación fue posteriormente mezclado con 1  $\mu\text{L}$  de TURBO DNasa y fue nuevamente incubado por 15 min a 37°C. Posteriormente fue resuspendido en 115  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas, y mezclado con un volumen similar de (1:1) fenol/cloroformo tratado con agua DEPC. La mezcla fue agitada y centrifugada a 14,000 g por 5 min, la fase acuosa fue pasada a un tubo nuevo donde se mezcló con un volumen similar de isopropanol y acetato de amonio 7.5 M, se almacenó por 15 min a -30°C para centrifugarse a 4°C a velocidad máxima por 20 min. La pastilla fue resuspendida en 10  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y el producto de síntesis fue dividido en alícuotas de 1  $\mu\text{l}$ , las cuales a su vez fueron cuantificadas al espectro para su posterior inyección en ovocitos de *Xenopus laevis*.

#### Obtención y procesamiento de ovocitos

Se utilizaron *Xenopus laevis* hembra, las cuales se anestesiaron por medio de hipotermia y se colocaron en decúbito dorsal sobre una superficie cubierta de hielo. Se procedió a realizar una incisión de aproximadamente 1 cm en piel a nivel del flanco derecho o izquierdo. Se procedió a disectar 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 de Barth modificado (pH 7.7, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.82 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.33 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.42 mM  $\text{CaCl}_2$  y 5 mM de HEPES) el cual fue suplementado con gentamicina a 0.1

mg/ml. Una vez extraídos los ovocitos se procedió a cerrar la incisión por capas con “cutgut” 5 ceros para músculo y peritoneo y con prolene 5 ceros para piel. Una vez terminada la intervención se dejó a la rana en recuperación durante 1 hora, tras lo cual fue transferida nuevamente a su pecera.

Con la finalidad de remover las células foliculares que rodean al ovocito, se trataron los folículos con colagenasa tipo I (Sigma ®), a una concentración de 0.5 mg/ml, disuelta en medio de Ringer (115 mM de NaCl, 2 mM de KCl) por 40 minutos. Los ovocitos se aislaron del resto del folículo con pinzas de punta fina y se incubaron a 16°C por 24 horas.

Los ovocitos se inyectaron a presión con un microinyector con agujas horneadas para eliminar cualquier contaminación con RNAsas. Se inyectaron 15.3 nl (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) de RNA ( $\rho$ 1 WT; L316E; L316I) en el polo vegetal del ovocito. De dos a cinco días después de la inyección, se homogeneizaron 10 ovocitos por condición, de manera independiente cada mutante y los controles inyectados con el receptor silvestre para el análisis de su expresión mediante Western Blot y de manera independiente se tomó un lote similar para su determinación funcional electrofisiológicamente.

#### Western Blot

Los ovocitos fueron separados en grupos de 10 y tratados con un amortiguador que contenía 10 mM de HEPES y 0.3 M sacarosa, y solubilizados en 0.8% Triton X-100; posteriormente fueron manipulados mecánicamente para eliminar el contenido citoplasmático, tratando enseguida los homogenados de membrana con un amortiguador de lisis el cual incluía los siguientes componentes:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
0.5 M Tris-Cl, pH 6.9	1.25 ml
10 % SDS, 0.35 M	2 ml
Glicerol	1 ml
2-mercaptoetanol	0.1 ml
Azul de bromofenol	0.2 mg
H <sub>2</sub> O deionizada	a 10.0 ml

Además se lisó retina bovina utilizando el mismo amortiguador. Se preparó un gel SDS-Acrilamida al 10% y se cargó cada pozo con 20  $\mu$ l de cada muestra, considerando: ovocitos inyectados con  $\rho$ 1; L316E; L316I, ovocitos inyectados con agua, y retina bovina.

#### Electroforesis en gel de policarilamida

Se corrieron las muestras en el gel separador a 60-80 mV por 25 minutos hasta que el colorante llegó al nivel del gel concentrador, una vez en éste se aumentó el voltaje a 120 mV y se corrieron las muestras por espacio de una hora. Una vez resuelto el gel se transfirieron las proteínas a una membrana de Nitrocelulosa utilizando una cámara húmeda de transferencia a 140 mV por espacio de una hora y media. Se lavó la membrana y se bloqueó con leche descremada (Bio-Rad ®) disuelta en solución de TBS-TWEEN por 2 horas. Se lavó nuevamente de 3-5 veces por espacio de 10 minutos y se agregó el primer anticuerpo, (dilución 1:100) anti- $\rho$ 1 desarrollado en cabra (Santa Cruz ®) y se incubó a temperatura ambiente en agitación toda la noche. Se lavó un par de veces más y se incubó a temperatura ambiente por espacio de una hora con el

segundo anticuerpo anti-cabra (Santa Cruz ®) desarrollado en conejo y acoplado a fosfatasa alcalina. Se reveló utilizando fosfato de 4-metilumbeliferol/nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT), durante aproximadamente 3-5 minutos.

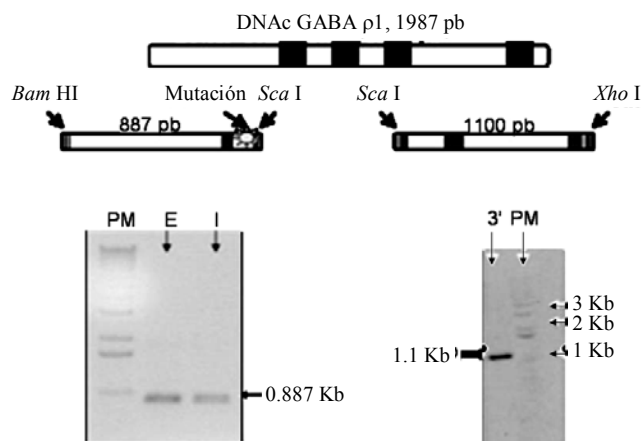
### Registros electrofisiológicos

Los registros se realizaron mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. Los microelectrodos se elaboraron con capilares de borosilicato y con un diámetro externo de 1.5 μm. Se colocó cada ovocito en una cámara de registro de 100 μl que fue continuamente perfundida con solución Ringer. Todos los registros se hicieron a temperatura ambiente (20 a 25° C), los ovocitos se mantuvieron a un potencial de membrana de -60 mV (usando un amplificador Warner OC-725 A; Warner Instruments, Corp. ®), los pulsos de voltaje se realizaron con el programa Pclamp ® Axon Instruments ® y los registros obtenidos en el osciloscopio (Nicolet 310 ®, Nicolet Instruments ®) fueron grabados y analizados.

## RESULTADOS

### Generación de Mutantes

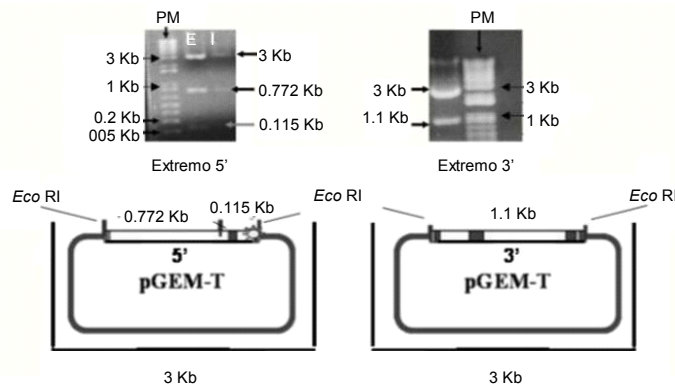
El resultado de la PCR fue la amplificación de dos productos que correspondieron a las dos mitades (5' y 3') de la secuencia de DNAC  $\rho$ 1: el extremo 5' flanqueado por sitios *Bam*HI y *Sca*I, que incluyó las mutaciones L316E y L316I, comprendiendo 887 pares de bases; y el extremo 3' flanqueado a su vez por sitios *Sca*I y *Xho*I que alcanzó 1100 pares de bases, **fig. 13**.



**Fig. 13. Amplificación de los extremos 5' y 3' de  $\rho$ 1**

### *Eco*RI

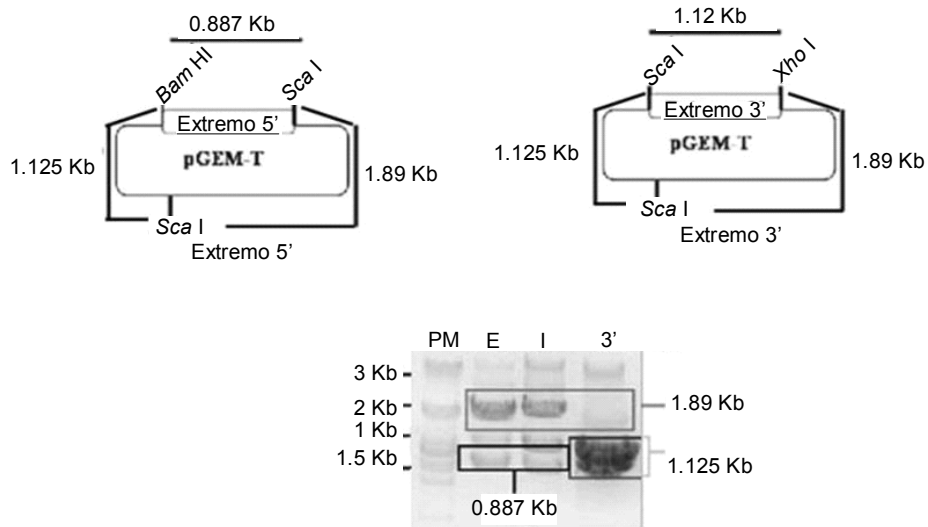
Los productos amplificados fueron clonados en el vector pGEM.T easy® y caracterizados mediante la enzima *Eco*RI. Este corte liberó al fragmento mutante generando tres bandas en pGEM.T 5', una correspondiente al vector de 3015 pares de bases, y dos al inserto: 772 y 115 pares de bases respectivamente. En pGEM.T 3' se generaron dos bandas la primera representando al vector y la segunda a la construcción, de 1100 pares de bases, **fig. 14**.



**Fig. 14. Caracterización enzimática en pGEM-T easy® (Eco RI)**

*Bam*HI-*Sca*I, *Sca*I-*Xho*I

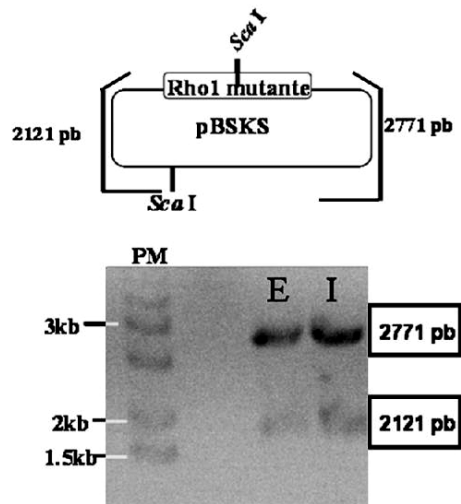
Los clones fueron caracterizados además por las enzimas *Bam*HI y *Sca*I en pGEM.T easy-extremo 5', liberando así la construcción de 887 pares de bases; y por *Sca*I y *Xho*I en pGEM.T easy-extremo 3' liberando a su vez una banda de 1.12 Kb, **fig. 15**.



**Fig. 15. Caracterización enzimática en pGEM-T easy® (*Bam*HI-*Sca*I, *Sca*I-*Xho*I).**

### Caracterización de $\rho$ 1 en pBSKS®

Se realizó una subclonación en el vector pBSKS reuniendo las dos mitades del receptor mutante  $\rho$ 1 (L316E, L316I) y se caracterizó con la enzima *Sca*I generando dos bandas de 2771 y 2121 pares de bases, **fig. 16**.



**Fig. 16. Subclonación y caracterización enzimática en pBSKS® (*Sca*I).**

### Caracterización en pCDNA3®

Posteriormente se subclonó  $\rho$ 1 en el vector pCDNA3 generando las construcciones pCDNA3-L316E y pCDNA3-L316I, las cuales fueron caracterizadas con la enzima *Hind*III generando así dos bandas de 6221 y 1153 pares de bases respectivamente, **fig. 17**.

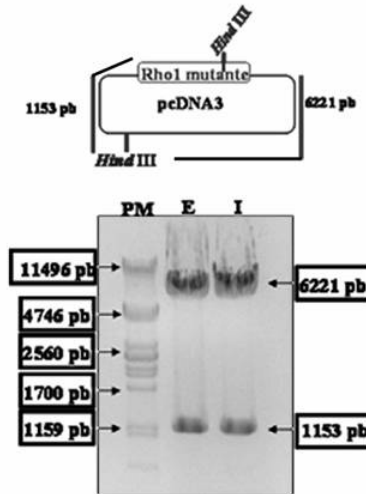


Fig. 17. Subclonación y caracterización enzimática en pcDNA3® (*Hind* III).

Secuenciación

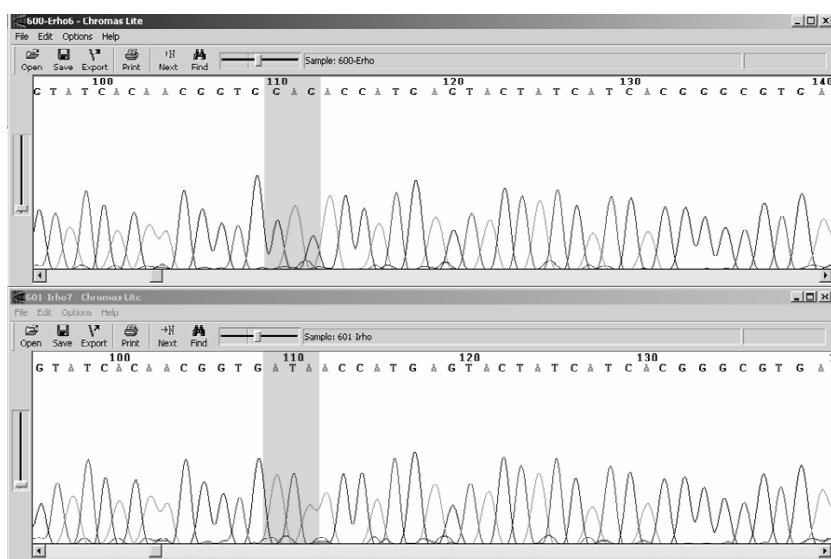
Ambos clones fueron secuenciados con un aparato ABI PRISM 310® Genetic Analyzer®. Las secuencias proporcionadas fueron alineadas con la secuencia de ρ1 obtenida de Genbank en el programa ClustalW, fig. 18.

L316E	GATGGTCATGCTGCTCTGGGTGTCCTTCTGGATGACCCGACAGCCGCTGCTGCCAGAGT	88
L316I	GATGGTCATGCTGCTCTGGGTGTCCTTCTGGATGACCCGACAGCCGCTGCTGCCAGAGT	87
GABArho1	GATGGTCATGCTGCTCTGGGTGTCCTTCTGGATGACCCGACAGCCGCTGCTGCCAGAGT	960
*****		
L316E	CCCCCTAGGTATCACAACCGTGGAGCCATGAGTACTATCATCACGGCGTGAATGCCTC	148
L316I	CCCCCTAGGTATCACAACCGTGAATAACCATGAGTACTATCATCACGGCGTGAATGCCTC	147
GABArho1	CCCCCTAGGTATCACAACCGTGGAGCCATGAGTACTATCATCACGGCGTGAATGCCTC	1020
*****		
L316E	CATGCCGCGGCTCTCTACATCAAGGCCGTGGACATCTACCTCTGGGTCAGCTTTGTGTT	208
L316I	CATGCCGCGGCTCTCTACATCAAGGCCGTGGACATCTACCTCTGGGTCAGCTTTGTGTT	207
GABArho1	CATGCCGCGGCTCTCTACATCAAGGCCGTGGACATCTACCTCTGGGTCAGCTTTGTGTT	1080
*****		
L316E	CGTGTTCCTCTCGGTGCTGGAGTATGGGGCCGTCAACTACCTGACCACTGTGCAGGAGAG	268
L316I	CGTGTTCCTCTCGGTGCTGGAGTATGGGGCCGTCAACTACCTGACCACTGTGCAGGAGAG	267
GABArho1	CGTGTTCCTCTCGGTGCTGGAGTATGGGGCCGTCAACTACCTGACCACTGTGCAGGAGAG	1140
*****		
L316E	CAAGGAACAGAAAGCTGCGGGAGAAGCTTCCCTGCACCAGCGGATTACCTCCGCCCGGCAC	328
L316I	CAAGGAACAGAAAGCTGCGGGAGAAGCTTCCCTGCACCAGCGGATTACCTCCGCCCGGCAC	327
GABArho1	CAAGGAACAGAAAGCTGCGGGAGAAGCTTCCCTGCACCAGCGGATTACCTCCGCCCGGCAC	1200
*****		
L316E	TGCGATGCTGGACGGCAACTACACTGATGGGGAGGTGAATGACCTGGACAACACTACATGCC	388
L316I	TGCGATGCTGGACGGCAACTACACTGATGGGGAGGTGAATGACCTGGACAACACTACATGCC	387
GABArho1	TGCGATGCTGGACGGCAACTACACTGATGGGGAGGTGAATGACCTGGACAACACTACATGCC	1260
*****		
L316E	AGAGAATGGAGAGAAGCCCGACAGGATGATGGTGCAGCTGACCCCTGGGCTCAGAGAGGAG	448
L316I	AGAGAATGGAGAGAAGCCCGACAGGATGATGGTGCAGCTGACCCCTGGGCTCAGAGAGGAG	447
GABArho1	AGAGAATGGAGAGAAGCCCGACAGGATGATGGTGCAGCTGACCCCTGGGCTCAGAGAGGAG	1320
*****		

Fig. 18. Alineamiento de secuencias mutantes (L316E, L316I), y silvestre (GABA ρ1), usando ClustalW.



Se encontraron las mutaciones introducidas incluyendo el sitio incorporado de *ScaI*. Una vez comparados los electroforetogramas de ambas secuencias, se confirmó la identidad de las mutaciones puntuales, **fig 19**.



**Fig. 19. Electroforetogramas de las secuencias mutantes (L316E, L316I), usando Chromas Lite ®. Se señalan los codones para Glutamato (GAG), e Isoleucina (ATA).**

## Western Blot

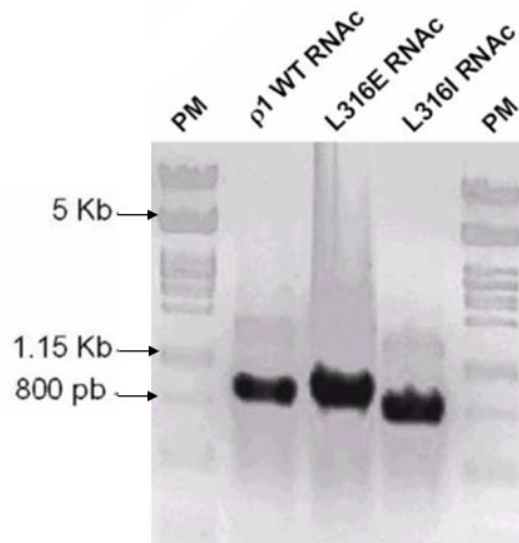
El resultado del Western Blot reveló que las membranas de los ovocitos inyectados contenían la proteína GABA $\rho$ 1, tanto en el caso del receptor silvestre como en los mutantes, mostrando así que el sistema estaba expresando la proteína. A pesar de que el peso predicho para  $\rho$ 1 es de ~47-50 kD, nosotros lo encontramos a ~60 kD, esto debido posiblemente a modificaciones postraduccionales de la proteína en ovocitos (acetilaciones, glicosilaciones, fosforilaciones). Como control positivo utilizamos un homogenado de retina, y como control negativo, ovocitos inyectados con agua, así como sin inyectar, **fig. 20**.



**Fig. 20. Western Blot.** Escala de peso molecular (60 y 40 kDa); (Ctrl +) retina; (Ctrl -) ovocitos sin inyectar, o inyectados con agua; ( $\rho 1$  WT) homogenado de ovocitos expresando el receptor nativo; y los mutantes ( $\rho 1$  L16E); y ( $\rho 1$  L316I).

### Transcripción *in vitro*

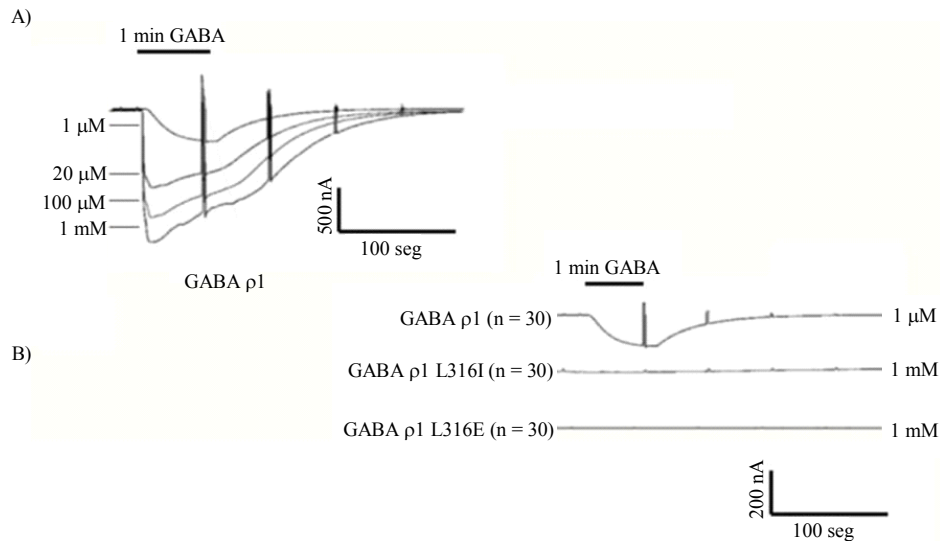
Se realizó la síntesis de RNAc utilizando el kit mMESSAGE mMACHINE<sup>®</sup> T7 (Ambion<sup>®</sup>), usando como molde los mutantes (L316E; L316I), y el receptor nativo ( $\rho 1$  WT), clonados en el vector de expresión pCDNA3<sup>®</sup>, **fig. 21**. Los RNAc generados fueron inyectados en ovocitos de *Xenopus laevis*.



**Fig 21. Transcripción in Vitro.** Escala de peso molecular de DNA ( $\lambda$  *Pst*I); transcritos ( $\rho 1$  WT, L316E, L316I).

## Registros electrofisiológicos

Los registros electrofisiológicos (**fig. 22**) mostraron una corriente entrante ante la activación del receptor GABA $\rho$ 1 a diferentes concentraciones de GABA (1 mM, 100  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 1  $\mu$ M). Sin embargo, contrario a lo esperado y de manera muy interesante, los dos mutantes (L316E y L316I) no produjeron ninguna corriente al ser expresados de manera independiente en ovocitos,  $n = 30$ ;  $N = 5$  ( $n =$  No. de ovocitos;  $N =$  No. de ranas), **fig. 22**, pese a que éstos son traducidos eficientemente, como se mostró en la **fig. 20**.

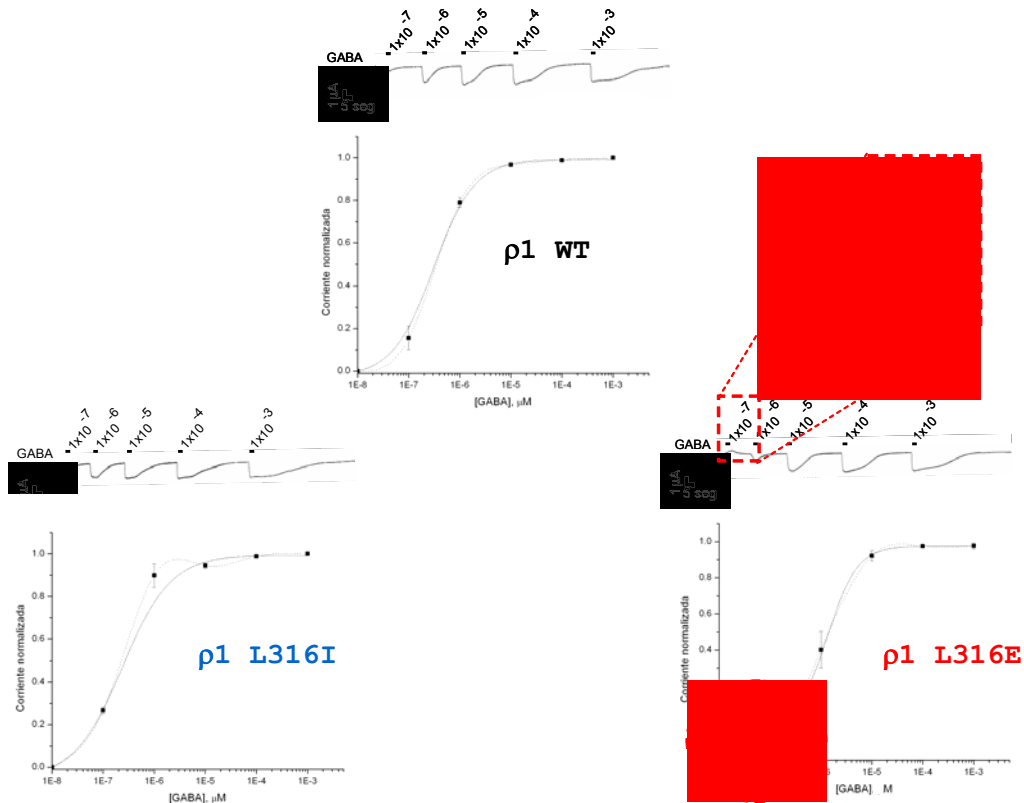


**Fig. 22. Respuestas electrofisiológicas en ovocitos.** **A)** Respuestas generadas por GABA  $\rho$ 1 a distintas concentraciones del agonista; **B)** comparación entre la corriente generada por 1  $\mu$ M de GABA del receptor nativo ( $\rho$ 1), y los mutantes (L316E y L316I).

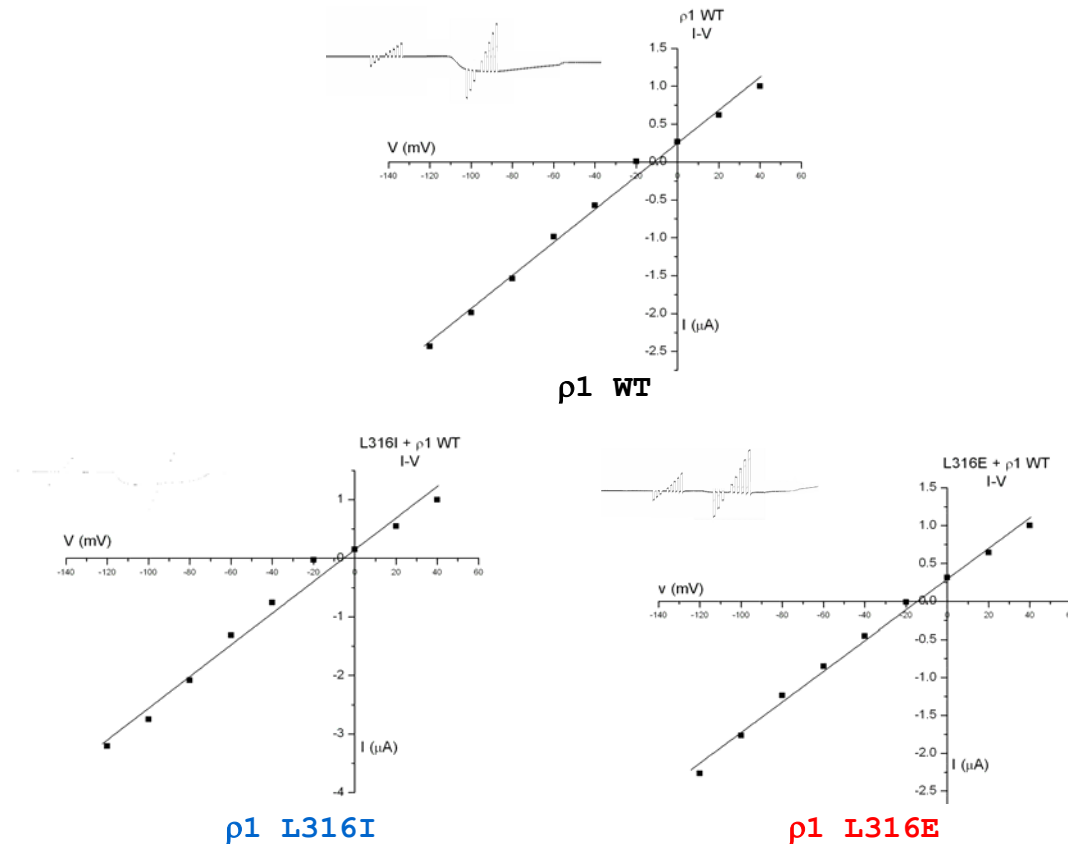
### Coexpresión de mutantes y receptores silvestres

Los registros electrofisiológicos mostraron resultados distintos ante la coexpresión (1:1) de receptores heteroméricos L316E +  $\rho$ 1; y L316I +  $\rho$ 1. Los resultados fueron tabulados (**n = 6**), y son representados en las **figs. 23** (dosis/respuesta) y **24** (relación corriente/voltaje).

El heterómero L316I +  $\rho$ 1 silvestre mostró un comportamiento muy parecido al de  $\rho$ 1 silvestre; sin embargo, en el caso del heterómero L316E +  $\rho$ 1 silvestre encontramos que la concentración mínima de GABA ( $1 \times 10^{-7}$  M) fue capaz de generar una pequeña corriente, pero en sentido inverso. Por otra parte, los  $EC_{50}$  no variaron significativamente entre  $\rho$ 1WT y L316I +  $\rho$ 1 ( $3.3 \times 10^{-7}$  y  $2.75 \times 10^{-7}$ , respectivamente), mientras que L316E +  $\rho$ 1 fue ligeramente mayor ( $1.46 \times 10^{-6}$ ). Los coeficientes de Hill fueron similares entre sí tanto en  $\rho$ 1WT, como en los mutantes L316E +  $\rho$ 1, y L316I +  $\rho$ 1 (2.13, 2.24, y 1.91, respectivamente).

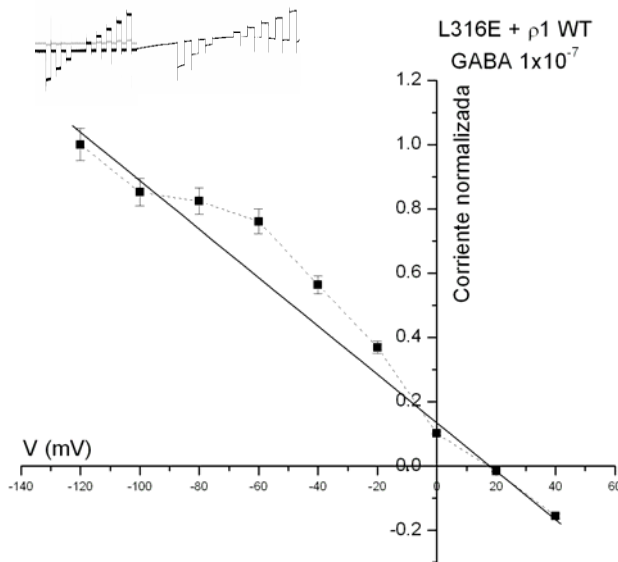


**Fig 23. Relación dosis respuesta.** Se utilizaron distintas concentraciones de GABA ( $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-3}$  M) en el receptor  $\rho$ 1 nativo (WT) y los mutantes (L316E +  $\rho$ 1, L316I +  $\rho$ 1), la corriente fue normalizada y la concentración se graficó con una escala logarítmica. La flecha señala una inversión en la corriente generada por GABA  $1 \times 10^{-7}$  M en el mutante L316E +  $\rho$ 1. Barras calibradoras X =  $1 \mu$ A; Y = 5 seg



**Fig 24. Relación corriente/voltaje.** Se aplicaron pulsos de voltaje con variaciones periódicas (-140 mV a 40 mV, con intervalos cada 20 mV), tanto a los receptores mutantes (L316E, L316I), como al nativo ( $\rho 1$  WT). El potencial de inversión fue en todos los casos  $\sim -20$  mV, como predice la ecuación de Nernst para el  $Cl^-$  en ovocitos en Ringer (Kusano et al., 1977).

Para probar la naturaleza dada por la inversión de la corriente realizamos una relación I/V a esta concentración de GABA ( $1 \times 10^{-7}$  M), **fig. 25.** y encontramos que la conductancia con GABA era menor respecto a la conductancia sin el agonista.



**Fig. 25. Relación corriente-voltaje en heterómeros L316E +  $\rho$ 1 WT ante la activación de  $1 \times 10^{-7}$  GABA.**

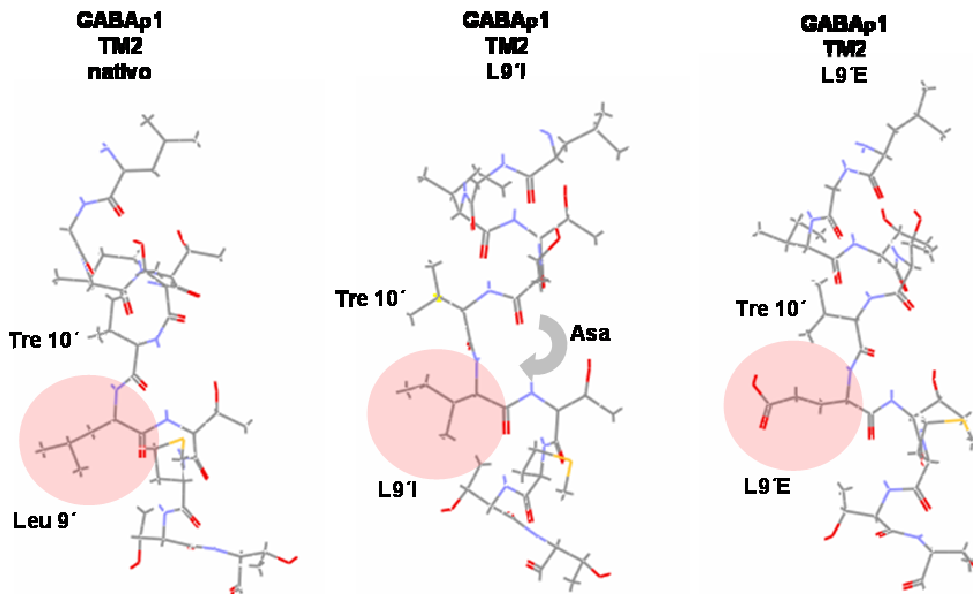
n = 5

## DISCUSIÓN

La discusión se enfocará en la estructura de la  $\alpha$  hélice que forma el canal iónico del receptor, y sobre estudios estructura-función de mutantes puntuales de esta región en varios receptores de la familia “cys-loop”.

En el receptor GABA<sub>C</sub> se pueden predecir con cierto grado de confianza los residuos que se encuentran accesibles al paso de los iones en su segundo segmento transmembranal, puesto que específicamente en esta región tiene una similitud enorme respecto a las subunidades  $\alpha$  tanto de los receptores GABA<sub>A</sub> como de Glicina, siendo con éste último cercana al 90%. En base a estas mismas similitudes utilizamos la  $\alpha$  hélice del segundo segmento transmembranal del receptor de Glicina obtenido por RMN reportada en el Protein Data Bank (Yushmanov et al., 2003), para modelar las mutaciones *in silico*, tanto de L316E (L9'E) como de L316I (L9'I) del receptor GABA<sub>C</sub> usando el programa PyMOL (DeLano Scientific LLC. ©). Una vez realizado el análisis, se determinó que el cambio generado en L9'E fue bastante significativo pues el incremento de volumen en la

cadena lateral disminuye significativamente la integridad de la hélice y por consiguiente probablemente la permeabilidad, lo cual corresponde directamente con nuestros datos. Por otro lado, y contrario a lo esperado, el cambio en L9'I genera una interrupción muy importante en la hélice cambiando el ángulo de enlace y produciéndose un asa entre T10' e I9' impidiendo también la permeabilidad iónica, **fig. 26**. Estos cambios fueron pues importantes y destacan las finas interacciones entre aminoácidos vecinos, necesarios para la modificación estructural producida ante la activación del receptor. Los trabajos relacionados con mutagénesis como las mutaciones puntuales pueden generar cambios fundamentales en la estructura global de la proteína, dificultando su interpretación al tratar de relacionar la estructura de ésta con su función, tal como se pone de manifiesto en este trabajo.



**Fig 26. Representación de las modificaciones estructurales generadas por las mutaciones L316I (L9'I) y L316E (L9'E), en el receptor GABA<sub>C</sub>.**

La función de una proteína sólo puede comprenderse describiendo su estructura, es decir, la relación tridimensional entre los átomos que la componen (Voet y Voet,



1995). El receptor GABA<sub>C</sub> así como el GABA<sub>A</sub> son dos de los receptores más estudiados de la familia de receptores ionotrópicos abiertos por ligando (LGIC). Se han realizado esfuerzos muy importantes tratando de determinar la relación existente entre estructura y función, sin embargo se debe puntualizar que no existe actualmente una estructura generada por cristalografía de rayos X de cualquier LGIC, los mejores datos estructurales han surgido de imágenes de criomicroscopías electrónicas del receptor nicotínico de Acetilcolina procedente del pez *Torpedo*, con una resolución cada vez mayor gracias al potenciamiento computacional (Unwin, 2000). En estos estudios se pudo determinar que el diámetro del poro se estrecha dentro de la membrana. En el estado cerrado del receptor este estrechamiento se encuentra desde aproximadamente los residuos 9' a 15', pero en el estado abierto la región más angosta se encuentra en el extremo intracelular de la hélice correspondiente al segundo segmento transmembranal, alrededor del residuo 2' (Miyazawa et al., 2003; Unwin, 2000). También existen datos electrofisiológicos los cuales sugieren que el poro iónico de los LGIC se estrecha hasta formar una constricción cerca de la boca intracelular (Lester, 1992). Las inferencias de un estrechamiento intramolecular del poro han sido verificadas extensamente utilizando el método de acceso por sustitución de cisteínas (SCAM), que incluye no sólo al receptor acetilcolinérgico (Akabas et al., 1994; Wilson & Karlin, 2001), sino también al receptor GABA<sub>A</sub> (Xu et al., 1995; Xu y Akabas, 1996) y al receptor serotoninérgico (5-HT<sub>3A</sub>) (Panicker et al., 2002). El diámetro de este estrechamiento se da en un rango de aproximadamente 0.5 a 0.9 nm en los distintos LGIC y estas diferencias, además de las cargas electrostáticas parecen reflejar la selectividad aniónica o catiónica de cada tipo de canal (Keramidas et al., 2004). Las medidas en el potencial de flujo en el receptor acetilcolinérgico han sugerido que la longitud de este estrechamiento de la segunda región transmembranal es de aproximadamente 0.3-0.6 nm.

Algunos experimentos que involucran mutantes puntuales han tenido el objetivo de encontrar el mecanismo de control que permite la apertura del canal; experimentos precursores (Imoto et al., 1991) se sujetaron a la polaridad de las cadenas laterales de los residuos que forman el poro en el receptor acetilcolinérgico.

Se puede predecir que cualquier mutación realizada en alguno de los residuos encontrados en la parte más estrecha del canal afectará la conductancia, ya sea

exponiendo a diferentes cadenas laterales que interactúen con los iones que atraviesan la membrana ó por cambios en el diámetro del poro. Las sustituciones polares pueden soportar una mayor conductancia en el canal que las sustituciones no polares, aunque para ambas clases químicas la conductancia disminuye una vez que incrementa el volumen de la cadena lateral (Imoto et al., 1991; Villarroel et al., 1991). De manera interesante, mutando el residuo equivalente (G2') en la subunidad  $\alpha 1$  del receptor de Glicina, (por una alanina, la cual es ligeramente mayor) causa un incremento moderado en la conductancia (Bormann et al., 1993). Esto último fue interpretado por los autores como un cambio conformacional el cual causa una modificación importante en la estructura del segundo segmento transmembranal, más que un simple efecto estérico (Bormann et al., 1993).

Considerado de esencial interés para este trabajo, la mutación de la leucina L9' del receptor nicotínico (el residuo más conservado en el segundo segmento transmembranal de todos los LGIC) causa, en adición a cambios en la apertura de canal, la aparición de un nuevo y variable estado de conductancia. No está claro como el poro de este estado "conductor desensibilizado" da origen a un mayor estado de conductancia, y cómo la estructura del poro puede diferir del estado fisiológico más abierto. Estudios subsecuentes sobre la mutación del mismo canal también reportaron un nuevo estado de conductancia, aunque la magnitud de este nuevo estado de conductancia fue totalmente distinto (Palma et al., 1997). De esto es especialmente relevante que los cambios en la conductancia no fueron observados en receptores acetilcolinérgicos musculares heteroméricos, y se han hecho diferentes interpretaciones para explicar los cambios en la apertura del canal (Kosolapov et al., 2000). En caso de generarse el estado desensibilizado conductor, debemos inferir un plegamiento distinto generado por el cambio conformacional del receptor nicotínico.

Otros estudios de mutagénesis por SCAM (Xu et al., 1995; Xu y Akabas, 1996) han generado información concerniente a la exposición relativa de los residuos que forman el poro de los LGIC. El patrón de residuos expuestos en el estado abierto de LGIC es similar, pero no idéntico, para cada uno de sus miembros. En general, los residuos expuestos a lo largo del canal forman una línea recta que corre a lo largo de la principal  $\alpha$  hélice en el segundo segmento transmembranal.

El receptor GABA<sub>A</sub> compuesto de las subunidades  $\alpha$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 2 fue examinada mediante SCAM substituyendo individualmente a cada residuo del segundo segmento transmembranal de la subunidad  $\alpha$ 1 por una cisteína (Xu y Akabas, 1996). Los residuos encontrados que se exponían a lo largo del poro y por tanto se exponían también al paso de los iones, crearon un ambiente predominantemente polar dentro del canal. Seis aminoácidos polares estaban expuestos, mientras que tres no polares no lo estaban. Es aparente una periodicidad distinta desde la región más extracelular del canal hasta la posición L9'. La región extracelular del canal comienza con residuos polares y cargados (R19' y N20') seguidos por dos residuos consecutivos, en aproximadamente una vuelta en la hélice transmembranal, el primero de los cuales es polar y el segundo no polar. Este patrón helicoidal continúa con un residuo polar (T13'), seguido por uno polar adyacente (T10') y uno no polar (L9'). La región intracelular más estrecha del poro del receptor GABA<sub>A</sub> está formada por los dos residuos polares consecutivos (T7' y T6') seguidos por un V2' no polar. Más allá de la posición 2', los residuos substituidos no reaccionaron significativamente cuando fueron sometidos a reactivos sulfhidrúlicos aplicados extracelularmente, reflejando posibles restricciones estéricas a su accesibilidad (Pascual y Karlin, 1998; Wilson y Karlin, 2001; Bera et al., 2002). Otros resultados obtenidos del SCAM de la subunidad  $\alpha$ 1 del receptor de Glicina sugiere una exposición de A20' y R19', especialmente en presencia del ligando (Lynch et al., 2001).

Considerando la gran similitud en la secuencia entre las segundas regiones transmembranales de las subunidades  $\alpha$ 1 de los receptores de Glicina y GABA<sub>A</sub>, es razonable que los residuos alineados entre 18' y 2' que están expuestos en la subunidad  $\alpha$ 1 del receptor GABA<sub>A</sub> estén también expuestos a los iones permeantes en el estado abierto del canal en la subunidad  $\alpha$ 1 del receptor de Glicina. Por tanto, los residuos que forman el poro durante el estado abierto en la subunidad  $\alpha$ 1 del receptor de Glicina son: A20'/R19', G17'/S16', T13', T10'/L9', T7'/T6', G2'. Esto fue confirmado posteriormente mediante SCAM en el mismo receptor de Glicina. Esta secuencia de residuos expuestos también genera un poro predominantemente polar con un patrón casi idéntico de residuos expuestos al paso de iones, reflejando la similitud en secuencia de las subunidades  $\alpha$  tanto de Glicina como de GABA<sub>A</sub>. En particular, la mitad intracelular del poro es formada con dos residuos polares adyacentes (T7' y T6') seguidos por un

pequeño residuo no polar (G2') aproximadamente una vuelta helicoidal adelante de la región más estrecha del poro. Los residuos que forman el poro del receptor acetilcolinérgico nicotínico muestran también cierta similitud con los de GABA<sub>A</sub>, con siete residuos en posiciones alineadas expuestos en ambos canales, aunque su naturaleza química es distinta.

La interposición de residuos expuestos del receptor acetilcolinérgico nicotínico revela una porción extracelular predominantemente hidrofóbica con L16', V13' y S10/L9' accesibles a reactivos sulfhidrúlicos (siendo S10' relativamente poco reactivo comparado al L9' adyacente en presencia del ligando). Intracelular a la posición 9', los residuos polares S6' y T2' también están expuestos en el estado abierto. Dentro de la región más central (Panicker et al. 2002) se reportó una exposición del residuo G10'. Entonces, la formación hidrofílica (polar) predominante del poro entero anión-selectivo en LGIC contrasta con la región extracelular hidrofóbica (no polar) y la región intracelular hidrofílica de los LGIC catión-selectivos. Otra diferencia importante respecto a la naturaleza de los poros catión y anión selectivos es el diámetro de poro mínimo estimado en los LGIC anión-selectivos, consistentemente menor que en los catión-selectivos. Los diámetros mínimos del receptor acetil colinérgico y serotoninérgico están en un rango de entre 0.74 y 0.84 nm (Dwyer et al., 1980; Yang, 1990; Cohen et al., 1992; Wang e Imoto, 1992), mientras que los diámetros de los receptores de Glicina, GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> están generalmente en el rango aproximado de 0.5-0.6 nm (Bormann et al., 1987; Fatima-Shad y Barry, 1993; Rundström et al., 1994; Wotring et al., 1999). Considerando estas evidencias juntas creemos que la modificación conformacional generada ante la activación de los receptores anión y catión selectivos podría no necesariamente proceder estrictamente en un patrón similar de interacciones aminoacídicas. Es decir, en la estructura fina, los aminoácidos que interactúan para que proceda dicho cambio conformacional deben ser distintos, si bien similares en sus aspectos generales, necesariamente distintos en las interacciones específicas.

Por otra parte, desde su clonación de una biblioteca de retina humana (Cutting et al., 1991), se determinó que el receptor GABA<sub>C</sub> forma homómeros. Además, se sabe también que  $\rho$ 1 es capaz de formar heterómeros con la subunidad  $\gamma$ 2 del receptor GABA<sub>A</sub> de la perca blanca al ser coexpresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* (Qian y Ripps,

1999), así como nativamente en la retina de los teleósteos (Pan y Qian, 2005). Además  $\rho 1$  es capaz también de interactuar con otros receptores de la misma familia, como las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y  $\beta$  del receptor de Glicina (Pan et al., 2000), e incluso otras familias de receptores, tal es el caso de los receptores de ATP ionotrópicos P2X2 que son estructural y funcionalmente distintos (Boue-Grabot et al., 2004).

Ante las premisas anteriores coexpresamos nuestras mutaciones de manera independiente con cantidades equimolares (1:1) del receptor silvestre ( $\rho 1$  WT), generando los heterómeros: L316E +  $\rho 1$ ; y L316I +  $\rho 1$ . Las propiedades cinéticas en ambos casos fueron similares a las del receptor silvestre, sin embargo, vale la pena destacar el caso del heterómero L316E +  $\rho 1$ , donde encontramos que la concentración mínima de GABA ( $1 \times 10^{-7}$  M) fue capaz de generar una corriente saliente. Lo anterior nos llevaría a pensar que esta pequeña concentración de GABA podría actuar incluso como un antagonista en un porcentaje de receptores quiméricos. La modificación en estos receptores es tal que, de manera basal el receptor mantiene una pequeña fuga una vez llevado el voltaje hasta -60 mV, y lo que parece ser una corriente saliente es, en realidad, un cambio conformacional en el poro que interrumpe esta fuga. Sin embargo, el cambio conformacional dado por concentraciones de GABA que ascienden y se mantienen en incremento es distinto, de tal forma que abren aún más el poro como sucede en el receptor silvestre. Anteriormente se reportó un cambio similar al realizar mutaciones en este mismo dominio por Ala (Pan et al., 1997), donde el fenotipo de la mutación observada generó un cambio en la actividad del canal. La mutación pudo convertir un estado cerrado (sin ligando) en un estado abierto, y a su vez el estado abierto (con ligando) se volvió un estado cerrado no conductor.

Las acciones dependientes de la concentración de GABA en el heterómero son probablemente debidas a eventos discretos, cada una involucrando la unión de una molécula de agonista al receptor. Durante la activación del agonista los complejos quiméricos pueden progresar a través de múltiples estados conformacionales, reflejando presumiblemente la unión de más de una molécula de agonista al receptor con diferentes afinidades intrínsecas. La corriente generada por altas concentraciones de GABA puede deberse a la unión de dos o más moléculas de GABA en el receptor, generando una

transición posterior del receptor al estado conformacional abierto por el ligando, tal como ocurre precisamente en el receptor silvestre.

## CONCLUSIONES

1. Los mutantes generados en este estudio (L316E, y L316I) no produjeron receptores funcionales homoméricos, al ser expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.
2. Los mutantes fueron coexpresados con cantidades equimolares (1:1) del receptor silvestre ( $\rho$ 1 WT), formando así los receptores: L316E +  $\rho$ 1, y L316I +  $\rho$ 1.
3. Las respuestas electrofisiológicas de los receptores L316I +  $\rho$ 1 fueron similares a las del receptor silvestre.
4. El receptor L316E +  $\rho$ 1 produjo una corriente saliente a la concentración de GABA  $1 \times 10^{-7}$  M.
5. La inversión de esta corriente puede deberse a la interrupción de una fuga basal en la membrana, generada posiblemente por el fenotipo de este posible receptor mutante heteromérico, de tal forma que GABA  $1 \times 10^{-7}$  M estabiliza el estado cerrado del canal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aidley DJ. 1998. *The physiology of excitable cells*. Cambridge: Cambridge University Press.
2. Aidley DJ y Stanfield PR. 1996. *Ion channels: molecules in action*. New York: Cambridge University Press.
3. Akabas MH, Kaufmann C, Archdeacon P, Karlin A. 1994. Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the alpha subunit. *Neuron* **13**, 919-27.
4. Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science-Taylor and Francis Group.
5. Amin J, Weiss DS. 1996. Insights into the activation mechanism of rho1 GABA receptors obtained by coexpression of wild type and activation-impaired subunits. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* **263**, 273 – 82.
6. Awapara J, Landua AJ, Fuerst R, Seale B. 1950. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J. Biol. Chem.* **187**, 35-9.
7. Barnard EA, Miledi R, Sumikawa K. 1982. Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **215**, 241-6.
8. Bera AK, Chatav M, Akabas MH. 2002. GABA (A) receptor M2-M3 loop secondary structure and changes in accessibility during channel gating. *J. Biol. Chem.* **277**, 43002–10.
9. Bormann J, Hamill OP, Sakmann B. 1987. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J. Physiol.* **385**, 243-86.
10. Bormann J, Rundstrom N, Betz H, Langosch D. 1993. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J.* **12**, 3729-37.
11. Bormann J. 2000. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* **21**, 16-9.

12. Boue-Grabot E, Emerit MB, Toulme E, Seguela P, Garret M. 2004. Cross-talk and co-trafficking between rho1/GABA receptors and ATP-gated channels. *J. Biol. Chem.* **279**, 6967-75.
13. Chang Y, Wang R, Barot S, Weiss DS. 1996. Stoichiometry of a recombinant GABAA receptor. *J. Neurosci.* 1996. **16**, 5415-24.
14. Chang Y, Weiss DS. 1998. Substitutions of the highly conserved M2 leucine create spontaneously opening rho1 gamma-aminobutyric acid receptors. *Mol. Pharmacol.* **53**, 511-23.
15. Cohen BN, Labarca C, Davidson N, Lester HA. 1992. Mutations in M2 alter the selectivity of the mouse nicotinic acetylcholine receptor for organic and alkali metal cations. *J. Gen. Physiol.* **100**, 373-400.
16. Connolly CN, Wafford KA. 2004. The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 529-34.
17. Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kasch LM, Montrose-Rafizadeh C, Donovan DM, Shimada S, Antonarakis SE, Guggino WB, Uhl GR, Kazazian HH. 1991. Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 DNAc: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**, 2673-7.
18. Dwyer TM, Adams DJ, Hille B. 1980. The permeability of the endplate channel to organic cations in frog muscle. *J. Gen. Physiol.* **75**, 469-92.
19. Enz R, Cutting GR. 1998. Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res.* **38**, 1431-41.
20. Enz R. 2001. GABA(C) receptors: a molecular view. *Biol. Chem.* **382**, 1111-22.
21. Fatima-Shad K, Barry PH. 1993. Anion permeation in GABA- and glycine-gated channels of mammalian cultured hippocampal neurons. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **253**, 69-75.
22. Feigenspan A, Bormann J. 1994. Differential pharmacology of GABAA and GABAC receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur. J. Pharmacol.* **288**, 97-104.
23. Feigenspan A, Wässle H, Bormann J. 1993. Pharmacology of GABA receptor Cl<sup>-</sup> channels in rat retinal bipolar cells. *Nature* **361**, 159-62.



24. Filatov GN, White MM. 1995. The role of conserved leucines in the M2 domain of the acetylcholine receptor in channel gating. *Mol. Pharmacol.* **48**, 379-84.
25. Guyton AC, Hall JE. 1997. *Tratado de Fisiología Médica*. México: Interamericana-McGraw Hill.
26. Hebert SC. 1998. General principles of the structure of ion channels. *Am. J. Med.* **104**, 87-98.
27. Imoto K, Busch C, Sakmann B, Mishina M, Konno T, Nakai J, Bujo H, Mori Y, Fukuda K, Numa S. 1988. Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature.* **335**, 645-8.
28. Imoto K, Konno T, Nakai J, Wang F, Mishina M, Numa S. 1991. A ring of uncharged polar amino acids as a component of channel constriction in the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett.* **289**, 193-200.
29. Johnston GA., 1996. GABA<sub>A</sub> receptors: relatively simple transmitter -gated ion channels? *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 319-23.
30. Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH. 2004. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **86**, 161-204.
31. Kosolapov AV, Filatov GN, White MM. 2000. Acetylcholine receptor gating is influenced by the polarity of amino acids at position 9' in the M2 domain. *J. Membr. Biol.* **174**, 191-7.
32. Kusano K, Miledi R, Stinnakre J. 1977. Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature.* **270**, 739-41.
33. Lester HA. 1992. The permeation pathway of neurotransmitter-gated ion channels. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 267-92.
34. Lynch JW, Han NL, Haddrill J, Pierce KD, Schofield PR. 2001. The surface accessibility of the glycine receptor M2-M3 loop is increased in the channel open state. *J. Neurosci.* **21**, 2589-99.
35. Macdonald RL, Olsen RW. 1994. GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 569-602.
36. Martin DL y Olsen RW. 2000. *GABA in the nervous system: The view at fifty years*: Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.

37. Martinez-Torres A, Miledi R. 2004. A single amino acid change within the ion-channel domain of the gamma-aminobutyric acid  $\rho$ 1 receptor accelerates desensitization and increases taurine agonism. *Arch. Med. Res.* **35**, 194-8.
38. Mathews, van Holde. Bioquímica, McGraw-Hill, 1998
39. Methot N, Ritchie BD, Blanton MP, Baenziger JE. 2001. Structure of the pore-forming transmembrane domain of a ligand-gated ion channel. *J. Biol. Chem.* **276**, 23726-32.
40. Miledi R, Parker I, Sumikawa K. 1982. Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle RNAm in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **1**, 1307-12.
41. Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature.* **423**, 949-55.
42. Morel G. 1997. *Visualization of receptors: methods in light and electron microscopy*: New York: CRC Press.
43. Nayeem, N, Green TP, Martin IL, and Barnard EA. 1994. Quaternary structure of the native GABA<sub>A</sub> receptor determined by electron microscopici analysis. *J. Neurochem.* **62**, 815-18.
44. Ogata N. 1990. Pharmacology and physiology of GABAB receptors. *Gen Pharmacol.* **21**, 395-402
45. Ortells MO y Lunt GG. 1995. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* **18**, 121-27.
46. Palma E, Maggi L, Eusebi F, Miledi R. 1997. Neuronal nicotinic threonine-for-leucine 247 alpha7 mutant receptors show different gating kinetics when activated by acetylcholine or by the noncompetitive agonist 5-hydroxytryptamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**, 9915-9.
47. Pan Y, Qian H. 2005. Interactions between rho and gamma2 subunits of the GABA receptor. *J. Neurochem.* **94**, 482-90.
48. Pan ZH, Zhang D, Zhang X, Lipton SA. 1997. Agonist-induced closure of constitutively open gamma-aminobutyric acid channels with mutated M2 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**, 6490-5.

49. Pan ZH, Zhang D, Zhang X, Lipton SA. 2000. Evidence for coassembly of mutant GABA<sub>C</sub>  $\rho$ 1 with GABAA  $\gamma$ 2S, glycine  $\alpha$ 1 and glycine  $\alpha$ 2 receptor subunits in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 3137-45.
50. Panicker S, Cruz H, Arrabit C, Slesinger PA. 2002. Evidence for a centrally located gate in the pore of a serotonin-gated ion channel. *J. Neurosci.* **22**, 1629-39.
51. Parker I, Sumikawa K, Miledi R. 1986. Neurotensin and substance P receptors expressed in *Xenopus* oocytes by messenger RNA from rat brain. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **229**, 151-9.
52. Pascual JM, Karlin A. 1998. State-dependent accessibility and electrostatic potential in the channel of the acetylcholine receptor. Inferences from rates of reaction of thiosulfonates with substituted cysteines in the M2 segment of the  $\alpha$  subunit. *J. Gen. Physiol.* **111**, 717-39.
53. Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 4318-22.
54. Qian H, Ripps H. 1999. Response kinetics and pharmacological properties of heteromeric receptors formed by coassembly of GABA  $\rho$ - and  $\gamma$  2-subunits. *Proc. Biol. Sci.* **266**, 2419-25.
55. Ragozzino D, Woodward RM, Murata Y, Eusebi F, Overman LE, Miledi R. 1996. Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acid C receptor antagonist. *Mol Pharmacol.* **50**, 1024-30.
56. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 1996. *Vocabulario Científico y Técnico*: Madrid: Editorial Espasa Calpe, S.A.
57. Revah F, Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Mulle C, Hussy N, Bertrand S, Ballivet M, Changeux JP. 1991. Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature.* **353**, 846-9.
58. Roberts E, Frankel S. 1950. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* **187**, 55-63.
59. Rundström N, Schmieden V, Betz H, Bormann J, Langosch D. 1994. Cyanotriphenylborate: subtype-specific blocker of glycine receptor chloride channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**, 8950-4.

60. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
61. Tester M. 1997. Techniques for studying ion channels: an introduction. *J. Exp. Bot.* **48**, 353-9.
62. Unwin N. 2000. The Croonian Lecture 2000. Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of fast synaptic transmission. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**, 1813-29.
63. Unwin N, Miyazawa A, Li J, Fujiyoshi Y. Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the alpha subunits. 2002. *J. Mol. Biol.* **319**, 1165-76.
64. Villarroel A, Herlitz S, Koenen M, Sakmann B. 1991. Location of a threonine residue in the alpha-subunit M2 transmembrane segment that determines the ion flow through the acetylcholine receptor channel. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **243**, 69-74.
65. Wang F, Imoto K. 1992. Pore size and negative charge as structural determinants of permeability in the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor channel. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **250**, 11-7.
66. Ward JM. 1997. Patch-clamping and other molecular approaches for the study of plasma membrane transporters demystified. *Plant Physiol.* **114**, 1151-9.
67. Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Thompson SA, Wafford KA. 1999. Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann. NY Acad. Sci.* **868**, 645-53.
68. Wilson G, Karlin A. 2001. Acetylcholine receptor channel structure in the resting, open, and desensitized states probed with the substituted-cysteine-accessibility method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**, 1241-8.
69. Woodward RM, Polenzani L, Miledi R. 1992. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. I. Effects of Cl<sup>-</sup> channel inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **42**, 165-73.

70. Woodward RM, Polenzani L, Miledi R. 1993. Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (rho-like) gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of gamma-aminobutyric acid A and gamma-aminobutyric acid B receptor agonists and antagonists. *Mol. Pharmacol.* **43**, 609-25.
71. Woodward RM, Polenzani L, Miledi R. 1994. Effects of fenamates and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on rat brain GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 806-17.
72. Wotring VE, Chang Y, Weiss DS. 1999. Permeability and single channel conductance of human homomeric rho1 GABA C receptors. *J. Physiol.* **521**, 327-36.
73. Xu M, Akabas MH. 1996. Identification of channel-lining residues in the M2 membrane-spanning segment of the GABA (A) receptor alpha1 subunit. *J. Gen. Physiol.* **107**, 195-205.
74. Xu M, Covey DF, Akabas MH. 1995. Interaction of picrotoxin with GABAA receptor channel-lining residues probed in cysteine mutants. *Biophys. J.* **69**, 1858-67.
75. Yakel JL, Lagrutta A, Adelman JP, North RA. 1993. Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **90**, 5030-3.
76. Yushmanov VE, Mandal PK, Liu Z, Tang P, Xu Y. 2003. NMR structure and backbone dynamics of the extended second transmembrane domain of the human neuronal glycine receptor alpha1 subunit. *Biochemistry* **42**, 3989-95.
77. Zhang D, Pan Z, Zhang X, Brideau AD, Lipton SA. 1995. Cloning of a gamma-aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 11756-60.