

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



---

---

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

*Campus Juriquilla*

**DINAMICA DEL RECEPTOR GABA<sub>CP2</sub>-GFP  
EN CELULAS BIPOLARES DE RETINA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICA**

**P R E S E N T A :**

**GUSTAVO MARTÍNEZ DELGADO**

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



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## DEDICATORIA

A MIS PADRES, IRENE Y ABRAHAM

A MIS HERMANOS, HERMAN Y ABRAHAM

AL SER, DE LA VIDA

## AGRADEZCO

A MI FAMILIA

DR. ADOLFO GARCIA-SASTRE

M. en C. EDITH ESPINO SALDAÑA

DR. CARLOS TREVIÑO BECERRA

DR. RAFAEL JIMÉNEZ

DR. JOSÉ DOMINDO MÉNDEZ

## A LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO

DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES

DR. RICARDO MILEDI Y DAU

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ

DR. ALFONSO CÁRABEZ TREJO

LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR II INB-UNAM

LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA CELULAR INB-UNAM

JURADO ASIGNADO

AMIGAS, AMIGOS, PROFESORES,  
COMPAÑERAS DE FATIGA..

## RECONOCIMIENTO

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

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

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

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.**

**Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología**

A las Unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología; **Leonor, Yolanda, Magdalena y Carmen** (Enseñanza); **Nydia; Evelyn** (Unidad de microscopía electrónica); **Lourdes** (Videoconferencia); **Rafael, Ignacio y Pilar** (Biblioteca).

Al Jurado: **Dr. Mauricio Díaz, Dr. Juan Carlos Gómora, Dra. Rocio Salceda, Dra. Ana María López-Colomé** y al **Dr. Alfredo Varela**. Por sus sugerencias y preparación final del manuscrito.

Finalmente estoy particularmente agradecido con el **Dr. Adolfo García-Sastre** y los miembros del **Departamento de Microbiología del Hospital Monte Sinai**, por su enseñanza y por todo su apoyo para el final de este proceso.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	1
<b>ABREVIACIÓN EMPLEADA</b> .....	2
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	6
<i>GABA</i> .....	6
<i>Síntesis</i> .....	6
<i>Función</i> .....	6
<i>Receptores</i> .....	7
<i>GABA<sub>ρ</sub></i> .....	8
<i>Agonistas - Antagonistas</i> .....	9
<i>Moduladores</i> .....	10
<i>GABA<sub>ρ</sub> en retina</i> .....	10
<i>Tráfico de receptores GABA<sub>ρ</sub> en retina</i> .....	11
<i>Proteínas fluorescentes</i> .....	12
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	13
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	14
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	14
<i>General</i> .....	14
<i>Particulares</i> .....	14
<b>VI. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	15

<b>VII. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>16</b>
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>IX. DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>X. CONCLUSION.....</b>	<b>41</b>
<b>XI. REFERENCIAS.....</b>	<b>42</b>
<b>Apéndice A.....</b>	<b>48</b>
<b>Apéndice B.....</b>	<b>50</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia de construcción adenoviral Ad5GABA $\rho$ 2GFP	18
Figura 2. Expresión de GFP en neuronas	23
Figura 3a. Caracterización del vector recombinante pShuttle-CMV-GABA $\rho$ 2-GFP	23
Figura 3b. Caracterización del vector recombinante pAdEasy-GABA $\rho$ 2-GFP	24
Figura 4. Células HEK 293 transfectadas con el vector linealizado pAdEasy- $\rho$ 2GFP	24
Figura 5. Transcrito y proteína de $\rho$ 2GFP	25
Figura 6. Cultivo primario de células de la retina	26
Figura 7. RT-PCR de Cultivos primarios	27
Figura 8. Complejos GABA $\rho$ 2-GFP en neuronas bipolares de la retina	28
Figura 9. Distribución de Ad5 $\rho$ 2GFP en neuronas bipolares	29
Figura 10. Distribución de diferentes diámetros de complejos GABA $\rho$ 2 en neuronas bipolares	30
Figura 10. Distribución de complejos GABA $\rho$ 2 a lo largo de la neurona bipolar	31
Figura 12. Dinámica de los complejos GABA $\rho$ 2-GFP en neuronas bipolares de la retina	32
Figura 13. Dinámica de los complejos GABA $\rho$ 2-GFP en un solo plano focal	32

## ABREVIACIÓN EMPLEADA

<b>BSA</b>	albúmina sérica bovina
<b>D-MEM</b>	medio mínimo esencial D-galactopiranosido
<b>ADN</b>	ácido desoxiribonucleico
<b>EC<sub>50</sub></b>	concentración media del agonista, que produce el 50% del efecto máximo observado
<b>dNTP's</b>	desoxiribonucleosidos trifosfatos
<b>GABAA</b>	ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GABA</b>	receptores tipo A del ácido $\gamma$ -amino butírico
<b>GABA<sub>B</sub></b>	receptores tipo B del ácido $\gamma$ -amino butírico
<b>GFP</b>	proteína verde fluorescente
<b>h</b>	horas
<b>HEK</b>	células humanas embrionarias de riñón
<b>IHQ</b>	inmunohistoquímica
<b>mg</b>	miligramos
<b>min</b>	minutos
<b>ml</b>	mililitros
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	amortiguador salino de fosfatos
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>RT-PCR</b>	retrotranscripción-PCR
<b>Taq</b>	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
<b>U</b>	unidades de enzima
<b>U.V.</b>	luz ultravioleta
<b>X</b>	veces la concentración
<b>Pfu</b>	placa formadora de unidades
<b><math>\mu</math>g</b>	microgramos
<b><math>\mu</math>l</b>	microlitros

## Resumen

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor que juega un papel principal en la inhibición de la transmisión sináptica del sistema nervioso central (SNC), actuando a través de dos familias principales de receptores: GABAA y GABAB. Los receptores GABAA subunidades  $\rho$ , fueron descubiertos originalmente en la retina de mamífero y se conoce que tres genes codifican para el mismo número de subunidades  $\rho$ :  $\rho$ 1,  $\rho$ 2 y  $\rho$ 3. El estudio de las propiedades moleculares de estos receptores en las neuronas de la retina, ha sido limitada debido a la baja eficacia que ofrecen las técnicas convencionales de transfección en neuronas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue el estudio del direccionamiento del receptor GABA $\rho$ 2-GFP en neuronas bipolares de retina en cultivo, utilizando adenovirus como vector de expresión. Por microscopía confocal se observó, que la fluorescencia del receptor GABA $\rho$ 2-GFP se expresó de manera diferencial en la neurona bipolar de la retina. Observándose diferencias entre el tamaño medio y movilidad de las agrupaciones. Las agrupaciones de mayor diámetro ( $\sim 4.5 \mu\text{m}$ ) y con movilidad no perceptible, se localizaron en el soma. Mientras que las agrupaciones de menor diámetro ( $\sim 0.5 \mu\text{m}$ ), presentaron trayectorias de movilidad localizadas a lo largo del axón y el proceso axonal. Las observaciones reportadas en este trabajo, pueden ser el inicio de la saga de estudios que ofrecería en un futuro, la explicación de la biogénesis e inserción de los receptores GABA $\rho$  en la terminal axónica.

## Abstract

The  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) plays a major role in inhibitory transmission of the central nervous system acting through two main families of receptors: GABAA and GABAB. The GABAA receptors subunits  $\rho$ , were discovering originally in the mammalian retina and it is known that three genes encoding for the same number of GABAA  $\rho$  subunits:  $\rho$ 1,  $\rho$ 2 and  $\rho$ 3. However, the bipolar neurons of the retina, the main site of expression of GABA $\rho$  receptors, are unsuitable for transfection with standard methods. In this study we followed the traffic of the GABA $\rho$ 2-GFP receptor in retinal cells maintained in culture. We used an adenoviral vector that induced the highly efficient expression in retinal cells *in vitro*. Time-lapse laser confocal microscopy revealed that the fluorescence emitted by the GABA $\rho$ 2-GFP first accumulates in vesicles in the soma, then in at least two populations of vesicles along the axon; one that remains mostly immobile ( $\sim 4.5 \mu\text{m}$ ) and a second population of smaller vesicles ( $\sim 0.5-3 \mu\text{m}$ ) that moved constantly to and from the axon end. Thus, the observations reported here can be the beginning of the saga of studies that will permit to determine the fate of the receptors during their biogenesis and selective targeting in the synapses and with it, a possible mechanistic explanation for the incorporation of GABA $\rho$  receptors in the axon terminal.

## I. Introducción

El ácido de  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), es uno de los principales neurotransmisores inhibitorios del sistema nervioso central (CNS) de los vertebrados (Krnjević, 1974; Yasumi et al. 1997). Inicialmente se habían considerado tres familias de receptores mediante los que GABA llevaba a cabo su efecto: GABAA (subunidades  $\alpha$ 1-6;  $\beta$ 1-3;  $\gamma$ 1-3;  $\epsilon$ ,  $\tau$ ,  $\delta$ ,  $\pi$ ), GABAB (subunidades GABA<sub>B1</sub>, GABA<sub>B1a</sub> y GABA<sub>B2</sub>) y GABAC (subunidades GABA  $\rho$ 1-3). (Polenzani et al., 1991; Johnston et al., 1996; Zhang et al., 2001). Sin embargo, actualmente se considera a las subunidades  $\rho$ , dentro de la familia de los receptores GABAA (Enna, SJ. 2007; Olsen y Sieghart 2008).

Los receptores GABA $\rho$  se han localizado a lo largo del SNC (Cutting et al., 1991; López-Chávez et al., 2004; Alakuijala et al., 2005) y tejidos periféricos (Akasu et al., 1999; Jansen et al., 2000; Fletcher et al., 2001). Sin embargo, se sabe que los GABA $\rho$  se expresan predominantemente en neuronas de la retina (Enz et al., 1995; Ogurusu et al., 1995; 1997; Albrecht et al., 1997; Euler et al., 1996; Feingenspan et al., 1993; Feingenspan & Bormann 1994; Pan & Lipton 1995; Yeh et al., 1996; Zhang & Slaugther 1995; Enz et al., 1996; cutting et al., 1991) enriquecidos en la terminal axónica de las neuronas bipolares (Enz et al., 1995; el Koulen et al., 1998). Estas subunidades se distribuyen difusamente en las neuronas bipolares durante el desarrollo postnatal, pero forman complejos funcionales en la terminal axónica al día 10 postnatal (Koulen et al., 1998). Estos receptores no co-localizan con otras subunidades GABAA o receptores a Glicina (Hanley et al., 1999), pero se unen a la proteína asociada a microtúbulos (MAP1), sugiriendo que ésta ejerce una función de anclaje del receptor con el citoesqueleto, además de modular las propiedades del canal del receptor (Billups, et al., 2000).

Hasta el momento, no se ha explicado la ruta que siguen los receptores para su inserción en los dominios específicos de la membrana plasmática o si los receptores insertados, se mueven lateralmente después de la inserción (Martínez-Delgado G. Tesis Maestría 2006). De hecho los mecanismos moleculares que dictan la localización, número y ensamble de los receptores de GABA $\rho$  no se han esclarecido. Esto debido, entre otras razones, a que la visualización de receptores de GABA $\rho$  se ha limitado al uso de anticuerpos, metodología que presenta inconvenientes para estudiar el tráfico y ensamble de los receptores en células *in vivo*, limitando su uso para marcar receptores intracelulares en células sin permeabilizar. Además, se sabe que el proceso de fijación para microscopia puede ocasionar redistribución de proteínas e inducir cambios en la morfología de compartimientos endosomales (Carter y Sorkin 1998). Para elucidar el tráfico del receptor GABA $\rho$  en células bipolares de la retina, se utilizó la fusión del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) con la subunidad GABA $\rho$ 2. Esta fusión fue caracterizada electrofisiológica y molecularmente (Martínez-Delgado et al., 2010), la cual forma un receptor quimérico GABA $\rho$ 2-GFP que presenta características similares a las del tipo silvestre (López-Chávez et al., 2005).

En el presente trabajo se generó un adenovirus que porta esta quimera, el cual fue utilizado con el fin de que neuronas de retina mantenidas en cultivo expresaran al receptor GABA $\rho$ 2-GFP. En éstas se determinaron la distribución, y número de vesículas que portan al receptor. Este modelo experimental nos permitió confrontar preguntas biológicas cruciales tales como: “¿Cómo es que las neuronas dirigen la diversidad de receptores a, o y a neurotransmisores a diversas sinapsis, alcanzando una especificidad de señalización?” y específicamente “¿Cuáles son los elementos moleculares que permiten una segregación espacial en la distribución axonal del receptor GABA- $\rho$ 2 en neuronas bipolares en cultivo?”

## II. Antecedentes

### GABA

GABA es uno de los neurotransmisores inhibidores más importantes en el sistema nervioso central (SNC), de los vertebrados y participa en múltiples procesos fisiológicos y patológicos (Kandel et al., 2007). Como molécula, se describió por primera vez a principios de 1900, mientras que su presencia en el SNC y su papel como neurotransmisor se reconoció en la década de los 1950's (Awapara, et al., 1950; Florey, E. 1954; Krnjevic', K. 1974; Roberts y Frankel 1950). Durante las siguientes dos décadas, numerosos estudios determinaron el mecanismo específico de acción del GABA, y la evidencia más firme de su función inhibitoria en la corteza cerebral se estableció en 1960 (Krnjevic' y Phillis 1963). Se ha estimado que GABA es el neurotransmisor inhibitorio más abundante en el SNC, y participa en el 40% de las sinapsis inhibitorias en vertebrados adultos (Kandel et al., 2007; Kumar et al 2008).

### Síntesis

La síntesis de GABA, se lleva a cabo a partir de la actividad de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD). Esta presenta dos isoformas, la GAD65 y la GAD67, codificadas por dos genes distintos (Zigmond et al., 1999). El mecanismo de síntesis consiste en la remoción del grupo  $\alpha$ -carboxilo del glutamato, liberando CO<sub>2</sub> y produciendo el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Enna, 1997).

### Función

La función de GABA, que consiste en inhibir el potencial sináptico excitatorio de las neuronas, se lleva a cabo a través de la activación de receptores específicos que forman un canal permeable a Cl<sup>-</sup> o receptores acoplados a proteínas G, propiciando un potencial eléctrico más negativo en el interior celular (hiperpolarización), lo que favorece que sea más difícil el inicio de un potencial de

acción. Sin embargo, se ha observado que en estados tempranos del desarrollo del SNC de mamífero, GABA actúa también como neurotransmisor excitador. Esto debido a una diferencia en el potencial de equilibrio de Cl<sup>-</sup> producto de la falta de mecanismos de expulsión de Cl<sup>-</sup> en estas etapas del desarrollo (Thompson y Gahwiler 1989; Rivera et al., 1999; Stein y Nicoll, 2003).

## Receptores

Inicialmente, se encontró que GABA activa canales de Cl<sup>-</sup> sensibles a bicuculina. Posteriormente, se describió también una activación mediada por GABA de canales catiónicos sensibles a baclofeno (Bormann, 1988; Sivilotti y Nistri 1991). Este hallazgo llevó a la noción de la existencia de dos tipos de receptores, designados receptores GABAA y GABAB. Estudios posteriores llevados a cabo por el grupo del Dr. Miledi, mostraron la expresión de un tipo de respuesta al GABA insensible a bicuculina y baclofeno al inyectar ARNm de retina de bovino en ovocitos de *Xenopus laevis* (Polenzani et al., 1991; Woodward et al., 1992; 1993).

A mediados de la década de 1970 varios casos aislados describieron la existencia de un tipo de receptor GABA que era insensible a bicuculina, que contrastó con el efecto antagonista de este alcaloide en los clásicos receptores GABAA. Este componente peculiar también se encontró en varias áreas del SNC, incluyendo médula espinal de gato (Johnston et al., 1975; Jost et al., 2006), tectum óptico de rana (Nistri y Sivilotti, 1985; 1989), colículo superior de cuyo (Arakawa y Okada, 1988), el cerebelo y la corteza cerebral de rata (Drew y Johnston, 1992). Sin embargo, fue hasta 1991 cuando la expresión del ARNm de la retina en ovocitos de *Xenopus laevis* demostrara claramente la presencia de receptores GABA ionotrópicos, insensibles a las bicuculina y resistentes al baclofeno (Polenzani et al., 1991). Este nuevo receptor GABA fue nombrado  $\rho$  para denotar su origen retiniano.

La primer subunidad de esta familia de receptores fue clonada a partir de una

biblioteca de cDNA de retina humana. El gen fue llamado GABA  $\rho$ 1 (Cutting et al., 1991) y codifica un receptor que es abundante en la retina; cuando se expresa en ovocitos de *X. laevis* exhibe las mismas características que el receptor que se encuentra después de la inyección de ARNm de la retina. Para expresar de forma clara las propiedades farmacológicas y moleculares de este receptor, un nuevo nombre fue acuñado: el receptor GABAC, que comprendía en ese momento la subunidad GABA $\rho$ 1 pero con el tiempo creció hasta un total de tres subunidades: GABA $\rho$ 1, GABA $\rho$ 2, y el GABA $\rho$ 3. Actualmente, el nombre de receptores GABAC está en desuso, y los tres genes GABA $\rho$ , se incluyen en la familia de los receptor GABAA (receptor GABAA, subunidades  $\rho$ ). Estos receptores son parte de la superfamilia de Cys-loop de receptores de neurotransmisores, también llamados canales iónicos activos por ligando (LGIC), que incluye los receptores GABAA, los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChR), los receptores de glicina (GlyR), receptores ionotrópicos 5-HT (5HT3), y canal iónico activado por Zn<sup>2+</sup> (Olsen y Sieghart, 2008).

### **GABA $\rho$**

Con base en estudios realizados con otros receptores ionotrópicos y en las pruebas electrofisiológicas, se cree que las subunidades GABA $\rho$  se ensamblan para formar un pentámero y en el centro de este, se forma el canal de Cl<sup>-</sup>.

La estructura general de cada subunidad se compone de un dominio amino terminal extracelular, cuatro dominios transmembranales y un extremo carboxilo extracelular. El sitio de unión del GABA se encuentra en el dominio extracelular amino-terminal que, tras la activación, conduce a la apertura del canal iónico con el flujo de Cl<sup>-</sup> a través de él (Carland et al., 2004; Lester et al., 2004; Harrison y Lummis, 2005; Lummis et al., 2005). Hay tres características funcionales que son distintivas para los receptores GABA $\rho$ : el largo tiempo de apertura media del canal, baja conductancia y

baja tasa de desensibilización (Zhang et al., 2001; Zhu et al., 2007). El tiempo medio de apertura del canal oscila en los rangos de 150 a 200 ms, lo que es cinco veces mayor que lo que presentan otras subunidades de receptores GABA $\rho$  (Feigenspan y Bormann, 1994). Además, al aplicar repetidamente el agonista no disminuye la respuesta, en contraste con otros tipos de receptores ionotrópicos (Martinez-Torres et al., 1998; Polenzani et al., 1991). En la terminal del axón de las neuronas bipolares de la retina del pez dorado, la conductancia de los GABA $\rho$  es de 4 pS (Palmer, 2006), mientras en las neuronas bipolares de la rata es de 8 pS (Feigenspan y Bormann, 1994). En resumen, el canal homomérico de los receptores GABA $\rho$  conduce por más tiempo con respecto a las diferentes combinaciones de los receptores heteroméricos GABA $\rho$ , las conductancias son más pequeñas y tienen una tasa más baja de desensibilización; sin embargo, todavía se deben caracterizar estas propiedades para los receptores GABA $\rho$ 3 de las neuronas ganglionares de la retina (Ogurusu et al., 1997) y en otras áreas del cerebro que las expresan.

### **Agonistas-Antagonistas**

Cuatro agentes han sido de gran utilidad para el estudio de los receptores GABA $\rho$  debido a su alta selectividad: el ácido cis-4-aminocrotónico (ACAC) y cis-2-ácido aminometil ciclopropanocarboxílico (CAMP), que son los agonistas más selectivos para los receptores GABA $\rho$  (Woodward et al., 1993), mientras que el 1,2,5,6-tetrahidropiridin ácido-4 metilfosfinico (TPMPA) y el ácido 3-metilfosfínico aminociclopentil [(±)-] cis-3-ACPMPA son los antagonistas selectivos de GABA $\rho$  (Ragozzino et al., 1996; Chebib et al., 2007). Otros antagonistas han demostrado ser específicos para GABA $\rho$ 1, el ácido guanidino-acético, el ácido amino-fosfínico ciclopanotenil, y el ácido 3-aminociclobutano-fosfónico (Chebib et al., 2000; 2007), mientras que la ciclotiazida es antagonista para GABA $\rho$ 2 (Xie et al., 2008). Los ácidos butilfosfínico cis y trans-(3-aminociclopentanil) son una nueva generación de análogos de conformación restringida que bloquean competitivamente los receptores GABA $\rho$  y

previenen el desarrollo de la miopía en un modelo experimental (Chebib et al., 2009). Además, estos compuestos mejoran el aprendizaje y la memoria en ratas, según se evaluó mediante la reducción del tiempo que los animales tardan en encontrar la plataforma en el laberinto acuático de Morris, en comparación con ratas no tratadas con el bloqueador. Lo que sugiere un papel de los receptores GABA $\rho$  en procesos cognitivos (Chebib et al., 2009).

### **Moduladores**

La acción de GABA en los receptores GABA $\rho$  es modulada por una amplia variedad de entidades químicas que interactúan con distintos sitios de unión en el complejo del receptor GABA, ya sea actuando como inhibidores (Zn $^{2+}$ , Ni $^{2+}$ , Cd $^{2+}$ ) o potenciadores (Ba $^{2+}$ , Sr $^{2+}$ ) (Calvo et al., 1994; Kaneda et al., 2000). Los lantánidos potencian los receptores GABA $\rho$ 1 (Calvo et al., 1994; Goutman et al., 2005). Los GABA $\rho$  son insensibles a los moduladores de receptores GABA $\alpha$ , como las benzodiazepinas (Amin, 1999), los barbitúricos y neuroesteroides (Morris et al., 1999; Woodward et al., 1993) y más recientemente se conoce la modulación de estos receptores por protones (pH) y ciclotiazida (Qian, 2010).

### **GABA $\rho$ en retina**

Hallazgos electrofisiológicos e inmunohistoquímicos, indican que los receptores GABA $\rho$  (subunidades  $\rho$ 1 y  $\rho$ 2), se encuentran enriquecidos en las células bipolares de retina de mamíferos, enriquecidos principalmente en su terminal axónica; la subunidad  $\rho$ 3 en neuronas ganglionares de la retina (Ogurusu et al., 1997), mientras que otras subunidades de los receptores GABA $\alpha$  se encuentran tanto en el axón como en las dendritas (Enz 1996; Varela et al, 2005).

Cuando se aplica GABA a los terminales axónicas de las células bipolares se inducen corrientes de Cl $^{-}$  mediadas por los componentes GABA $\rho$  y por las otras subunidades

GABAA. En éstas células los GABA $\rho$  generan corrientes con tasas de activación y desactivación lentas y exhiben poca desensibilización; mientras que las corrientes generadas por las otras subunidades GABAA, se activan y desactivan rápidamente y muestran una alta desensibilización (Qian y Dowling, 1993;1995; Matthews et al, 1994; Lukasiewicz et al, 1994; Lukasiewicz y Shields, 1998; Shields, et al, 2000; Lukasiewicz et al, 2004; Casco et al, 2006). La distribución restringida de los GABA $\rho$  en el axón de las neuronas bipolares, sugiere que estos receptores juegan un papel altamente especializado en la transmisión sináptica. Su cinética de respuesta mucho más lenta y una mayor sensibilidad al GABA indican que la inhibición mediada por los GABA $\rho$  se lleva a cabo en una escala de tiempo sustancialmente distinta de la que es mediada por las otras subunidades los GABAA. Además, también hay indicios de que GABA $\rho$  podría mediar una función entre la actividad neuronal y la expresión génica (Song et al., 2005). Sin embargo los mecanismos moleculares que permiten la segregación espacial y funcional entre receptores GABA $\rho$  y el resto de los GABAA son poco entendidos (Palmer, 2006; Enz 1996; Varela et al, 2005; Palmer, 2006).

### **Tráfico de receptores GABA $\rho$**

Hasta el momento, no hay evidencia clara de cómo los receptores GABA $\rho$  se insertan en la membrana plasmática de las células, ni de los mecanismos moleculares que dirigen su localización, número y anclaje. Sin embargo, si la organización general de las sinapsis inhibitorias no es diferente de las sinapsis excitatorias (Kandel et al., 2007), se podría esperar un grado similar de regulación del tráfico de receptores. Por ejemplo, proteínas de andamiaje molecular (geferina y otras proteínas asociadas como GABARAP, Raft, Collibistina y Plic1 [Tovar KR, Westbrook, 1999]), estabilizan el citoesqueleto, en una asociación que garantiza la localización de receptores a glicina y el GABA (Mohrlüder y Schwarten, 2009). Así mismo, por medio de estudios utilizando microscopía confocal, se ha puesto de manifiesto que las sinapsis

inhibitorias también están sujetas a rápidos cambios estructurales (Choquet y Triller, 2003). De hecho, el estudio del tráfico de los receptores metabotrópicos de glutamato, los receptores AMPA, los receptores NMDA y los receptores a glicina ha establecido que dentro y fuera de la sinapsis, la movilidad lateral de estos receptores es un mecanismo importante en la organización de la membrana postsináptica (Serge et al., 2002; Tardin et al., 2003; Borgdorff et al., 2002; Choquet y Triller, 2003; Groc et al., 2004).

### **Proteínas Fluorescentes**

Trabajos previos, han reportado el marcaje fluorescente de proteínas celulares, para la obtención de proteínas quiméricas (Chalfie, M. y Kain, S. 1998, Miyawaki et al, 2003, Horton y Ehlers, 2003, Hu y Kerppola, 2003) para estudiar el tráfico intracelular y distribución incluso de receptores a neurotransmisores y canales iónicos (Martínez-Torres y Miledi 2000, Palma et al, 2001). Estos reportes sugieren que, la fusión del receptor con GFP no afecta considerablemente las propiedades del receptor recombinante *versus* el nativo (Martínez-Torres y Miledi 2000; Palma et al, 2001; Boyer et al., 2009; Arancibia-Cárcamo et al., 2009)

Por otra parte, se sabe de la baja eficiencia de transfección con metodologías convencionales de transfección en cultivos primarios, por lo que el uso de vectores adenovirales para expresar proteínas fluorescentes, fusionadas a los receptores en neuronas *in vivo*, ha venido a ser una herramienta de gran utilidad para estudiar la dinámica y localización de proteínas (Ivic et al., 2002). Estos vectores permiten la expresión en células en división y quiescentes y su aplicación para la expresión de neuroreceptores no altera las propiedades electrofisiológicas de éstos (Dutton et al., 2006; Lino et al., 2001; Cheng et al., 2001; Filippova et al., 2001).

Todos estos datos, sugieren que el marcaje de neuroreceptores con GFP, es una metodología viable para el estudio de receptores GABA $\rho$ 2.

### III. Justificación

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

Por otra parte, se sabe que en el SNC, el ARNm de GABA $\rho$ 2 tiene una alta expresión y una amplia distribución en comparación con GABA $\rho$ 1 (Wegelius et al., 1998; Rozzo et al., 2002). Así mismo, que los GABA $\rho$ 2 tienen una mayor afinidad al GABA y al ácido cis-4-aminocrotónico, siendo más sensibles a la picrotoxina (bloqueador) y muestran una tasa de desactivación más lenta que los GABA $\rho$ 1 (Qian, 2010; Martínez-Delgado et al., 2011). Todas estas propiedades pueden conferir características distintivas de las neuronas donde se expresan los GABA $\rho$ 2. Por lo que sería interesante dilucidar los mecanismos de tráfico y anclaje que dirige a estos receptores.

#### **IV. Hipótesis**

La expresión de la quimera GABA $\rho$ 2 -GFP permitirá la visualización del tráfico del receptor en neuronas bipolares de cultivos primarios de retina.

#### **V. Objetivos**

##### **Objetivo general:**

- Describir el tráfico intracelular del receptor GABA $\rho$ 2 en neuronas en cultivo

##### **Objetivos particulares:**

- Construir el vector adenoviral que contenga el ADNc que codifica para la subunidad GABA $\rho$ 2-GFP
- Describir la distribución y el movimiento del receptor marcado con GFP en neuronas bipolares de cultivos primarios de células de retina.

## VI. Diseño experimental

-Generación del plásmido pShuttle-CMV/GABA $\rho$ 2-GFP

-Recombinación in vivo en *E. coli* BJ5183 de pShuttle-CMV/GABA $\rho$ 2-GFP con el vector adenoviral pAd5

-Selección de clonas que contengan el producto de recombinación del vector adenoviral pAd5 $\rho$ 2-GFP

-Determinar la dinámica y distribución del receptor quimérico por microscopía de confocal en células de retina en cultivo.

## VII. Material y Métodos

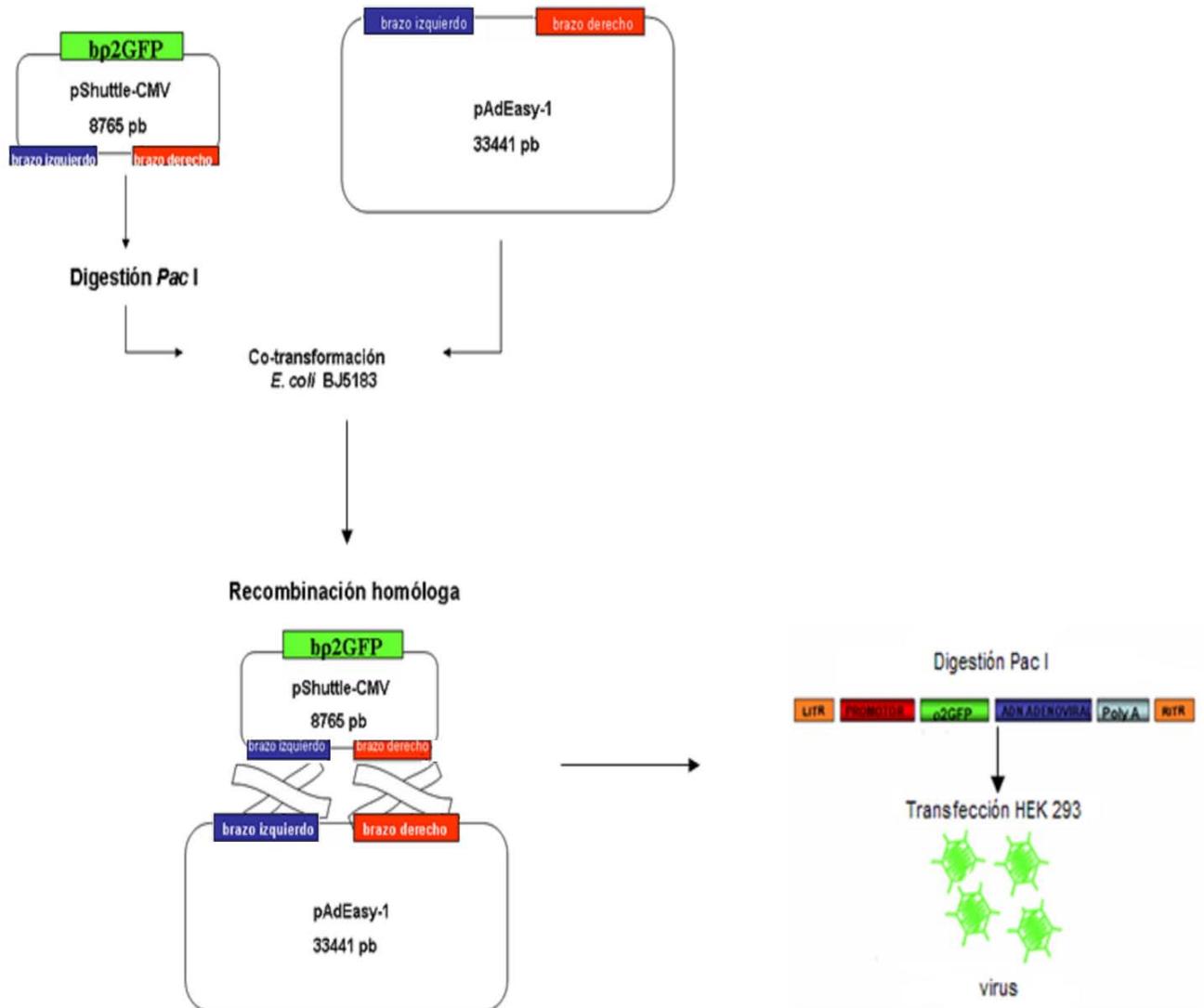
**Reactivos.** Retrotranscriptasa, Taq polimerasa, *Bam*HI, *Eco*RV, *Not*I, marcadores de ADN y proteína, DNA ligasa y Lipofectamina™ 2000 fueron adquiridas en Invitrogen USA. La enzima *Pac*I en New England Biolabs. El kit de purificación de DNA fue adquirido en QIAGEN, USA. La proteasa K se compró en Genetic Engineering Laboratory, USA. El vector pShuttle-CMV de MP Biomedicals. Los anticuerpos policlonales anti-GFP desarrollado en conejo y anti-conejo desarrollado en cabra se adquirieron en Santa Cruz, USA.

**Líneas celulares y medio.** Células de riñón embrionarias humanas (HEK293) y Madin-Darby de riñón canino (MDCK), se mantuvieron en medio DMEM (Sigma, UK) a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> y se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (Hyclone, EE.UU.). Las células HEK293 contienen los genes virales E1A y E1B de Ad5, que complementan la región esencial del adenovirus, para llevar a cabo la recombinación homóloga.

**Construcción del plásmido adenoviral Ad5GABA $\rho$ 2-GFP.** El plásmido pEGFPN2- $\rho$ 2 (que contiene la secuencia que codifica para GABA $\rho$ 2) fue digerido con las enzimas de restricción *Eco*RV y *Not* I. A su vez, el plásmido pCDNA3.1  $\rho$ 2 (que contiene la secuencia que codifica para GABA $\rho$ 2) se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RV. El producto de digestión 3' del plásmido pCDNA3.1  $\rho$ 2 se ligó con el producto de restricción 5' del plásmido pEGFP-N2- $\rho$ 2. Los productos digeridos fueron purificados y ligados con DNA T4 ligasa. Posteriormente, el plásmido pShuttle-CMV se digirió con *Bgl* II y *Not*I respectivamente. Así, el fragmento obtenido de la ligación de pCDNA3.1  $\rho$ 2 y pEGFP- $\rho$ 2 fue clonado en los sitios múltiples de clonación *Bgl*II y *Not*I del plásmido pShuttle. El producto de clonación fue caracterizado con la enzima *Eco*RV con los fragmentos correspondientes de 1350 pb y 8365 pb. Posteriormente, esta construcción fue linealizada con la enzima *Pme*I y se co-transformó en células

*E. coli* BJ5183 con el plásmido que contiene el esqueleto adenoviral pAd5. Finalmente, el adenovirus deficiente en replicación fue producido usando el sistema pAdEasy (He T. et al., 1998). Brevemente, el producto de recombinación homóloga (pAd5/GABA $\rho$ 2-GFP) fue transfectado en células HEK293 (confluencia ~70%) utilizando lipofectamina™ 2000 previa linealización de pAd5/GABA $\rho$ 2-GFP con *PacI* (Chartier et al., 1996). Las células se mantuvieron en medio de cultivo y fueron complementadas con 2% suero fetal bovino en frascos de plástico de 25 cm<sup>2</sup>. El efecto citopático se observó 8-11 días después de la transfección sugiriendo con ello la generación del adenovirus y lo cual se confirmó al ser visualizada la expresión de GFP con un microscopio de epifluorescencia (Olympus DX60). Para la colección del virus, las células se lisaron por 3 ciclos consecutivos de congelamiento (-80°C)/descongelamiento (37°C), colectando el virus (Ad5 $\rho$ 2GFP), del sobrenadante. Parte del lisado fue usado para infectar células HEK293 repetidamente hasta alcanzar un título considerable (1 X 10<sup>9</sup> pfu; [placa formadora de unidades]).

**Generación del adenovirus Ad5GABA $\rho$ 2-GFP.** El adenovirus Ad5GABA $\rho$ 2-GFP deficiente en replicación, se generó usando el sistema pAdEasy (He et al., 1998). Primero, GABA $\rho$ 2-GFP fue clonado en el vector acarreador pShuttle-CMV (MP Biomedicals) bajo el promotor CMV que dirigirá la transcripción del receptor quimérico. El plásmido resultante, pShuttle-CMV/GABA $\rho$ 2-GFP se digirió con *PmeI* y co-transformó con el vector adenoviral pAd5 en células *E. coli* BJ5183 (Figura 1).



**Figura 1. Estrategia de construcción adenoviral Ad5GABA $\rho$ 2GFP.**  $\rho$ 2-GFP fue clonado en los sitios múltiples de clonación *Bgl*II y *Not*I del plásmido pShuttle-CMV. El producto de clonación fue caracterizado con la enzima *Eco*RV con los fragmentos correspondientes de 1350 pb y 8365 pb. Posteriormente, esta construcción fue linealizada con la enzima *Pme*I y se co-transformó en células *E. coli* BJ5183 con el plásmido que contiene el esqueleto adenoviral pAd5.

Para identificar por PCR el adenovirus recombinante, 5 $\mu$ l del sobrenadante conteniendo el virus se agregaron en 10  $\mu$ l de proteasa K (1U/ $\mu$ l) y la mezcla fue incubada durante 1h a 55°C, posteriormente se llevó a ebullición en baño maría

durante 5 minutos. Un  $\mu$ l de la mezcla digerida se utilizó como molde para la reacción de PCR. Al mismo tiempo otra alícuota se preparó para la extracción de ADN viral por la metodología de Hirt (Hirt, 1967). Las condiciones de la PCR e iniciadores utilizados para la amplificación fueron los siguientes. Los iniciadores para la amplificación de GABA $\rho$ 2-GFP eran complementarios a los nucleótidos 1-2200 de la región del primer codón ATG de la secuencia del cDNA de  $\rho$ 2GFP. La secuencia específica de los cebadores de amplificación fue: 5' ATG CCT TAT TTT ACA AGA CTC ATT TTG 3' (sentido) y 5' GCC el GCT TTT ACTO TGT ACA GCT 3' (antisentido). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l y consistió de: 2 $\mu$ l de iniciadores (2.5  $\mu$ M), 0.75  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM), dNTP's 0.50  $\mu$ l (10 mM), 0.50  $\mu$ l de DNA Taq polimerasa (2.5 U/ $\mu$ l), 5  $\mu$ l 10X amortiguador de reacción de polimerasa, 3  $\mu$ l de ADN templado (GABA $\rho$ 2-GFP [ $\sim$ 50 ng]) y H<sub>2</sub>O a 50  $\mu$ l. Treinta ciclos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Flexigene). Cada ciclo incluyó 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 s alineamiento 55°C y 2 minutos de síntesis a 72°C. Después del último ciclo, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Veinticinco  $\mu$ l del producto de amplificación se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa 1% (conteniendo 0.5  $\mu$ g/ml bromuro de etidio, Gibco BRL).

**Western blot.** Cincuenta  $\mu$ l ( $\sim$ 5 $\mu$ g) del sobrenadante de células HEK infectadas con el virus  $\rho$ 2-GFP, se resolvieron en un gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) y eléctricamente fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Bio-rad). La unión inespecífica se bloqueó con TBS que contenía 5% (w/v) leche descremada durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se incubó con el anticuerpo policlonal anti-GFP desarrollado en conejo (1:1000) durante 16 h a 4°C seguido, por incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo (1:12000) durante 3 h. Después de lavados con PBS, se reveló con solución premezclada de 5 bromo-4 cloro-3 indolyl fosfato y nitroazul de tetrazolium como sustrato productor de color al actuar sobre fosfatasa alcalina (BCIP/NBT; Sigma).

**Cultivos primarios de retina.** Fueron utilizadas retinas de ratas macho *Wistar* de 9 días postnatales. Los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical, los ojos fueron rápidamente enucleados y hemisectados, la córnea, lente, e iris se eliminaron. Las retinas disecadas se lavaron cuidadosamente tres veces en solución fisiológica Hanks Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (BSS, GIBCO), posteriormente se incubó consecutivamente por un periodo de 20 min cada uno a 37°C 5% CO<sub>2</sub> en solución fisiológica Hanks Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> suplementada con 0.04% hialuronidasa (800 U/mg, Sigma) y 0.1% colagenasa (166 U/mg, Cooper Biomedical), posteriormente se llevaron a cabo otros 2 periodos de incubación (20 min cada uno) en una solución BSS libre de Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (CMF, Gibco) conteniendo 2.5 mM de etileno glycol-bis(P-aminoetil eter)N,IV,N',N'-ácido-tetraacetic (EGTA) y 0.015% de papaina (Sigma), la cual se activó 10 min con 2 mM de L-cisteína. Después de las incubaciones, las retinas se lavaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) con 0.1% albúmina de suero bovina (BSA, Sigma) y 0.02% deoxiribonucleasa (DNAse) (1,680 U/mg, Sigma), posteriormente las retinas se colocaron en medio DMEM suplementado con N2 1X y 0.005% de gentamicina (Invitrogen). Después de homogenizar el tejido, se realizó una dispersión mecánica a través de una pipeta de vidrio. Las células se colocaron en platos Petri con fondo de vidrio previamente incubados con poli-lisina (100 µg/ml, Sigma-Aldrich). Después del día 7, las células bipolares fueron identificadas alrededor de 10 neuronas bipolares por cultivo, por su morfología característica: soma aperlado, con axón largo y una arborización dendrítica en sentido opuesto (Enz et al., 1996).

**Microscopía de fluorescencia.** Células HEK293 fueron sembradas en platos con fondo de vidrio de 35cm<sup>3</sup>, y visualizadas por microscopia de fluorescencia 5-10 h después de ser infectados con Ad5GABA $\rho$ 2-GFP. Para eliminar autofluorescencia (producida por el medio de cultivo), el medio de cultivo se reemplazó con una solución extracelular que contenía los siguientes componentes: (en gramos por litro): 80 g NaCl (Sigma), 2 g KCl (Sigma), 14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma) y 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. (Sigma). Las células fueron visualizadas con un microscopio de fluorescencia Olympus (BX60)

y fotografiadas con una cámara Olympus (DP70). Las microfotografías fueron tomadas con el objetivo 40X. GFP fue excitado usando una lámpara de UV. En la mayoría de los casos, las microfotografías se realizaron con 1/8 s de exposición y ISO200 de sensibilidad.

**Microscopia confocal.** Células expresando Ad5 $\rho$ 2GFP o Ad5GFP se visualizaron con un microscopio confocal (LSM META 510 Zeiss), utilizando un objetivo de inmersión (aceite) 63x, 1.4 NA con diámetro del *pinhole* de 1 UA. En la mayoría de los experimentos el corte óptico (z-dimensión) fue de 2  $\mu$ m. La proteína GFP fue excitada con un láser de argón (488 nm) con 1-5% transmisión y emisión colectadas usando un filtro variable 500-550 nm. La aplicación de [N-(3-trietilammonopropyl)-4-(6-(4-dietilamino)fenil)-exatrienilo] dibromuro de piridinio] (FM4-64) fue extracelular, reemplazándose el medio después de su aplicación con solución de extracelular de lavado ( ver microscopía de fluorescencia). FM4-64 fue excitado con el láser HeNe (543 nm) con 1-2% transmisión y emisión colectada usando un filtro variable 680 nm. Un complejo de receptores GABA $\rho$ 2-GFP se definió como un complejo con diámetro de ~0.2-4.5  $\mu$ m y presentando aproximadamente dos-tres veces más intensidad de fluorescencia que el fondo. Todas las imágenes fueron adquiridas con una resolución 512x512 (bits). Los tiempos de captura de las imágenes fueron en el rango de 8-15 s para evitar el blanqueamiento de GFP. Las captura de imágenes y videograbación fueron ajustadas (brillo y contraste) y ensamblados con los software ImageJ (NIH) y AimImageExaminer. Los experimentos de transfección e infección se realizaron por 4-12 repeticiones por grupo.

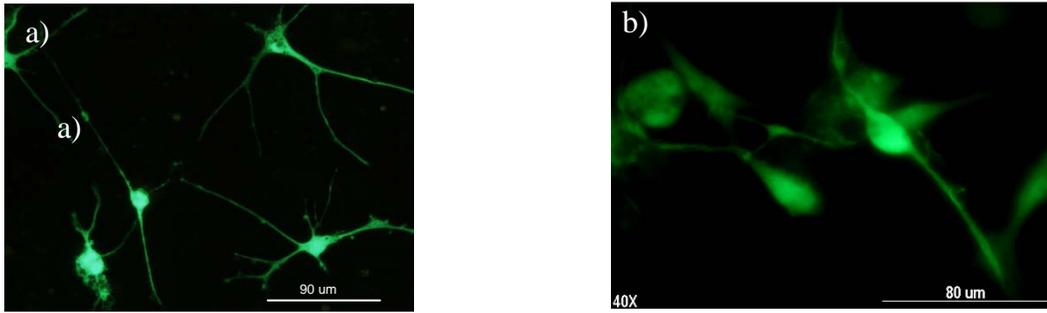
## VIII. Resultados

Inicialmente, se realizaron ensayos de transfección del plásmido GABA $\rho$ 2-GFP en neuronas bipolares utilizando diferentes metodologías que incluyeron tres repeticiones en cada ensayo (n=3):

Lipofectamina	N=10	Neuroreporter	N=7
Fosfato de Calcio	N=3	Electroporación	N=5

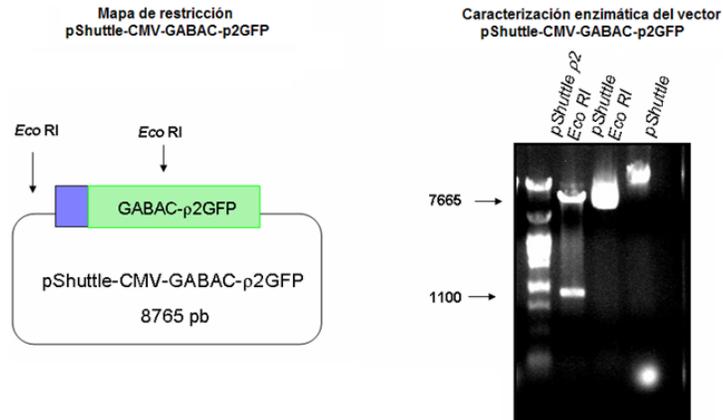
Pero no fue posible llevar a cabo la expresión de GABA $\rho$ 2-GFP. La alternativa para lograr la introducción del ADN recombinante en las células bipolares, fue el explorar la capacidad que ofrecen los vectores adenovirales. Éstos además de ser un vehículo potencial para la terapia génica son también muy eficientes en la transducción de células de linaje neuronal (Filippova et al., 2001; Cheng et al., 2001; Cheng et al., 2001b; Leil et al., 2004).

Inicialmente probamos que el Adenovirus Ad5 portando GFP bajo el promotor CMV puede inducir la expresión del gen reportero en neuronas en cultivos primarios. Para ello realizamos cultivos de neuronas de hipocampo (N=3 Procolo en apéndice) y de retina (N=5). Ambos fueron infectados después de 10 días en cultivo y se detectó la expresión de GFP 48 h después. Se obtuvo una eficiencia de expresión cercana al 95% en ambos cultivos (Figura 2). Por lo que se concluyó que el uso de un vector adenoviral representaría una estrategia factible para la expresión del receptor GABA $\rho$ 2 fusionado a GFP en neuronas.

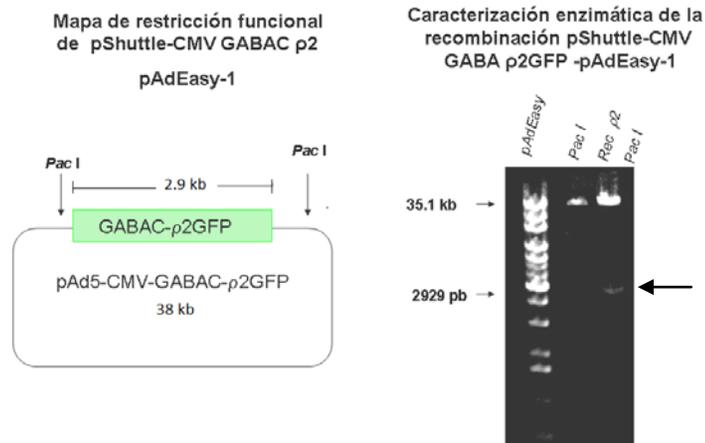


**Figura 2. Expresión de GFP en neuronas.** a) Infección de cultivos primarios de hipocampo y b) retina. 48 h postinfección, ambos cultivos mostraron una eficiencia de infección de la población del 95%.

Con base en estos resultados, se diseñó una estrategia de clonación para llevar a cabo la construcción adenoviral recombinante Ad5 $\rho$ 2GFP (Figura 1). En la primera parte, se obtuvo el plásmido pShuttle-CMV-GABA $\rho$ 2 (Figura 3a), posteriormente el producto de recombinación homóloga (pAd5/GABA $\rho$ 2 -GFP), se caracterizó con la enzima de restricción *Pac* I, por PCR (Figura 3).

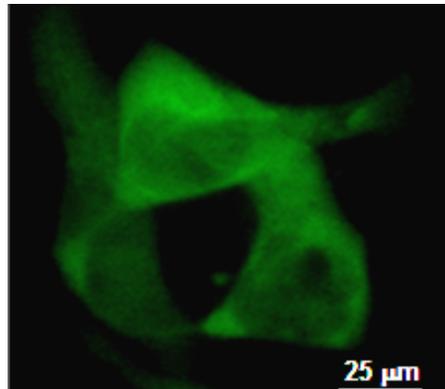


**Figura 3a. Caracterización del vector recombinante pShuttle-CMV-GABA $\rho$ 2-GFP.** El vector fue digerido con la enzima *Eco* R I con los fragmentos resultantes de 1.1 kb y 7.6 kb.



**Figura 3b. Caracterización del vector recombinante pAdEasy-GABA $\rho$ 2-GFP.** El vector fue digerido con la enzima *Pac I* con los fragmentos resultantes de 35.1kb y 2929 pb. Línea 1 marcador; 2- digestión con pAdEasy; 3- digestión de pAdEasy-GABA $\rho$ 2GFP con *Pac I*.

Para asegurar que los virus recién generados permitían la expresión de GABA $\rho$ 2-GFP se observó su expresión en células HEK 293 por microscopía de epifluorescencia (Figura 4) y se determinó la expresión del transgen por RT-PCR (Figura 5a) y por Western blot (Figura 5b).

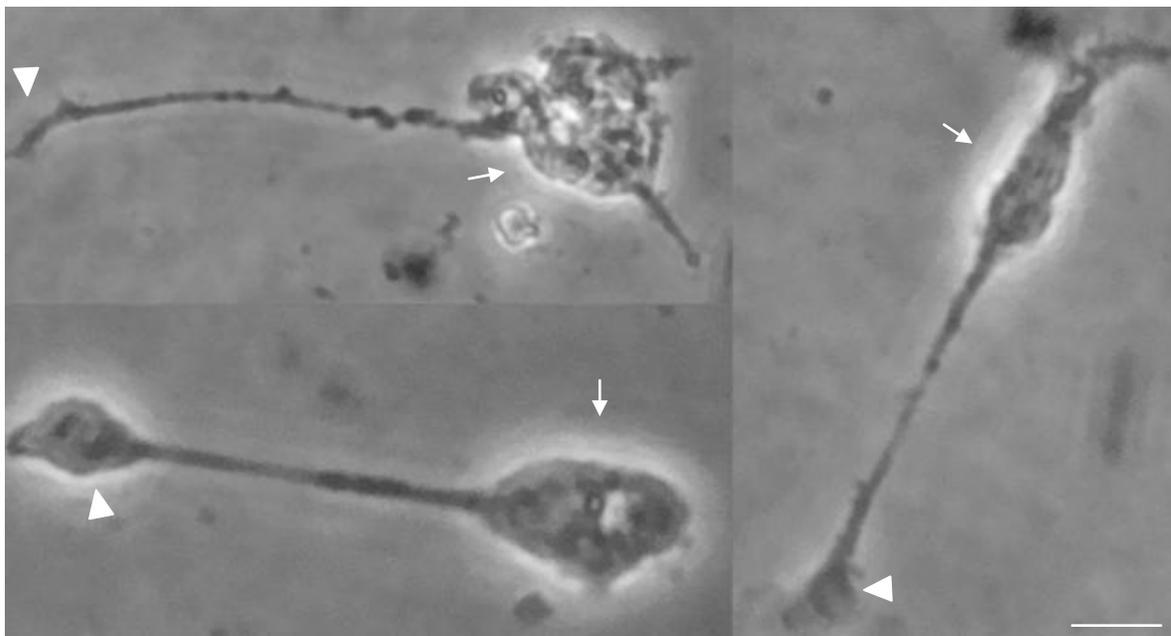


**Figura 4. Células HEK 293 transfectadas con el vector linealizado pAdEasy- $\rho$ 2GFP.** La fluorescencia indica la expresión de  $\rho$ 2GFP (epifluorescence 20X). [Barra= 25  $\mu$ m]



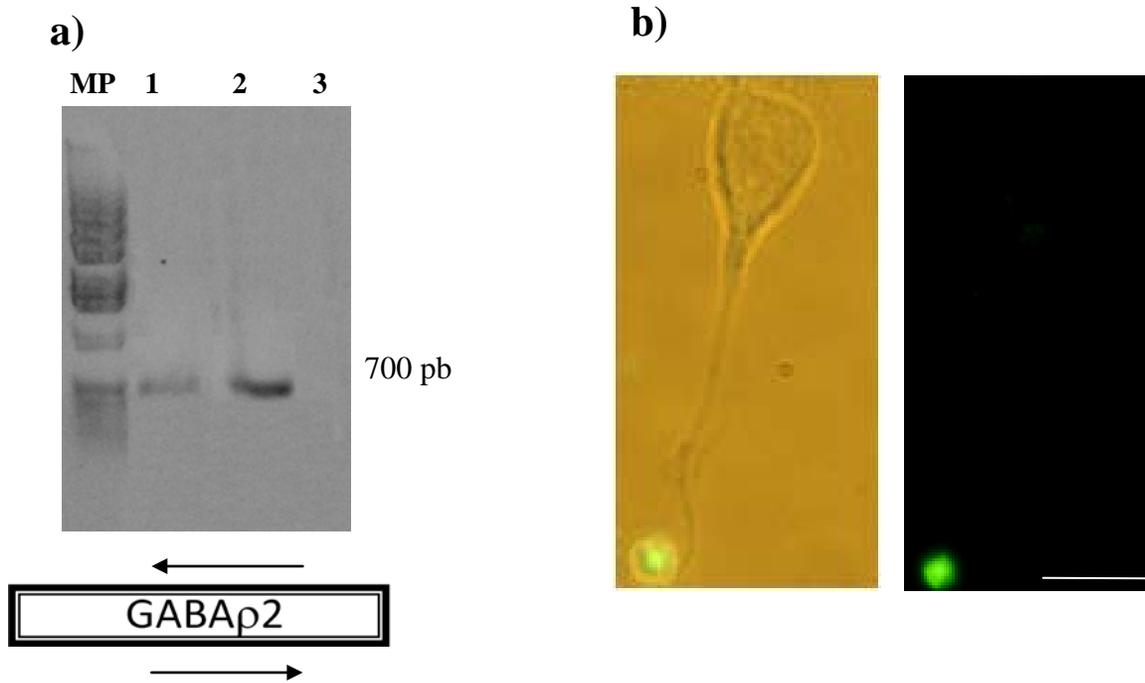
**Figura 5. Transcrito y proteína de  $\rho$ 2GFP.** a) Ensayo de PCR de células HEK 293 infectadas con el vector adenoviral, mostrando un transcrito de 2200 pb correspondiendo a la amplificación del cDNA de  $\rho$ 2GFP. b) Ensayo de Western blot en homogenado de células HEK infectadas con el vector recombinante que porta el cDNA de  $\rho$ 2GFP. Se muestra una proteína con un peso aproximado de 80 kDa correlacionando con el peso predicho para la proteína  $\rho$ 2GFP.

**Cultivos primarios de neuronas bipolares de retina.** La expresión de receptores GABA $\rho$  en células bipolares de la retina ha sido demostrada por diversas técnicas: electrofisiológicas, inmunohistoquímicas, hibridación *in situ* y RT-PCR, mostrando que las subunidades GABA $\rho$  se localizan en la terminal axónica de las neuronas bipolares de retina de mamíferos (Feigespan et al., 1993; Enz et al., 1996; Koulen et al., 1997; Vaquero y De la Villa, 1999). Para estudiar el tráfico del receptor, se implementaron cultivos primarios de retina. Después de 6-10 días *in vitro*, se observó la diferenciación de varios tipos de neuronas y glia (Figura 6).



**Figura 6. Cultivo primario de células de la retina.** Neuronas bipolares de cultivo primario de retina de rata, 9 días *in vitro*. Microfotografías de cultivo primario de retina, la cual representa la mayoría de las neuronas bipolares aisladas obtenidas en los cultivos. Las flechas muestran el soma y las cabezas de flecha la terminal axónica. [Barra = 10  $\mu$ m]. La identidad de estas células fue identificada por su reacción a PKC (Figura 8).

Las células bipolares fueron identificadas, basadas en su morfología característica (Karschin y Wässle 1990; Pan y Lipton 1995; Euler y Wäsle, 1995). Además, la presencia del transcrito y la proteína GABA $\rho$ 2, fueron determinadas por RT-PCR (Figura 7a) e inmunocitoquímica (ICQ) respectivamente (Figura 7b).



**Figura 7. RT-PCR de Cultivos primarios.** A) El producto de RT-PCR fue resuelto en un gel de agarosa al 0.8 %. De acuerdo a los iniciadores utilizados, se obtuvo un amplicón de 700 pb que codifican para GABA $\rho$ 2. Marcador de peso molecular (MP); Control positivo de reacción de RT-PCR (1) que consistió en el plásmido pCDNA 3.1- $\rho$ 2; y amplicón esperado de 700 pb para GABA $\rho$ 2 (2) y control negativo (3) que no incluyó la retrotranscriptasa. B) Inmunolocalización de la proteína GABA $\rho$ 2 en cultivos primarios. La reactividad con el anticuerpo anti GABA $\rho$ 2, se observó principalmente en la terminal axónica neuronas bipolares de la retina como se observa en la microfotografía. [Barra= 30  $\mu$ m]

La ICQ se realizó en células no permeabilizadas usando un anticuerpo policlonal anti- $\rho$  (reconocimiento del N-terminal) desarrollado en conejo (Figura 7b).

Finalmente, para comprobar la identidad de las neuronas bipolares, se realizó una inmunocitoquímica en los cultivos primarios usando un anticuerpo monoclonal anti-PKC alfa (datos no mostrados). El cual se ha utilizado de manera convencional para la identificación de neuronas bipolares en cultivo (Negishi et al., 1988). Por lo que habiendo establecido los cultivos primarios de retina y caracterizado las neuronas

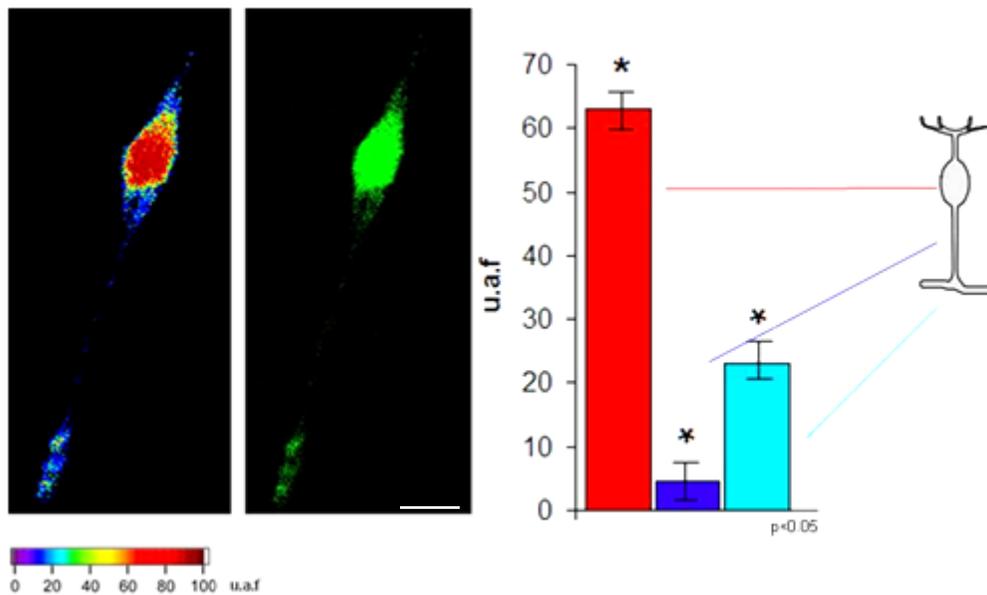
bipolares por ensayos de ICQ. El siguiente paso fue el determinar el tráfico *in vivo* del receptor GABA $\rho$ 2-GFP, rastreando la etiqueta (GFP) por microscopía confocal.

**Tráfico y anclaje de GABA $\rho$ 2-GFP en neuronas bipolares.** Para lograr la expresión de GABA $\rho$ 2-GFP, inicialmente infectamos los cultivos con diferentes cantidades de Ad5GFP (vector control), para estimar el porcentaje de células que pueden infectarse y se observó su expresión hasta 96 h después de la infección, tiempo en el que las neuronas permanecieron vivas. Después de este período se observó su capacidad de llevar un cabo la endocitosis de FM4-64 y no se observaron cambios en la morfología de las neuronas. Se determinó que 300  $\mu$ l de virus, era volumen necesario para infectar los cultivos. Los resultados mostraron que 18 h post-infección con Ad5GFP el ~90% de la población celular del cultivo, expresó GFP y ~70% de la población infectado con Ad5GABA $\rho$ 2-GFP expresó GABA $\rho$ 2-GFP.



**Figura 8. Complejos GABA $\rho$ 2-GFP en neuronas bipolares de la retina.** En tiempos tempranos de infección (4-8 hr), fue posible la visualización de complejos GABA $\rho$ 2-GFP en neuronas bipolares. Estos complejos mostraron ser una población heterogénea (~0.2-4.5  $\mu$ m). Microfotografía representativa de 50 experimentos independientes con replica de dos cada uno. Cabeza de flecha (terminal axónica) y flecha (soma) [Barra = 10  $\mu$ m].

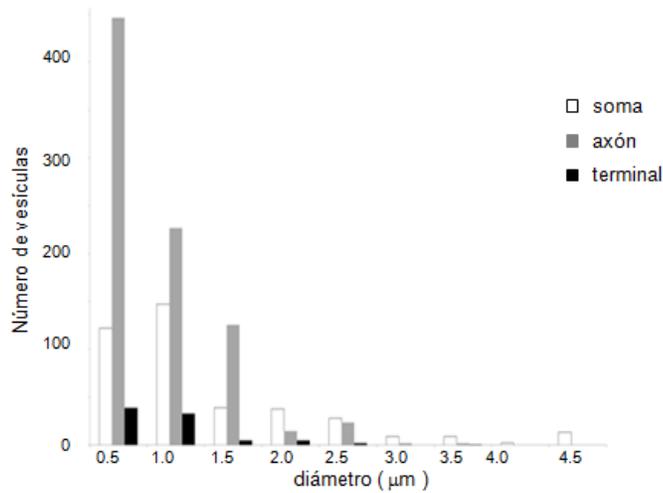
Después de 10 horas post-infección con Ad5GFP y Ad5GABA $\rho$ 2-GFP. Las neuronas expresando GFP mostraron una distribución homogénea de fluorescencia, mientras que la fluorescencia de las neuronas expresando GABA $\rho$ 2-GFP fue localizada principalmente en tres compartimientos: el soma, proceso axonal y la terminación axónica. (Figura 8). Para definir las diferencias entre éstos tres dominios de la neurona expresando GABA $\rho$ 2-GFP, hicimos una comparación en función de la intensidad de fluorescencia presentada en cada dominio (Figura 9).



**Figura 9. Distribución de Ad5 $\rho$ 2GFP en neuronas bipolares.** La distribución de fluorescencia de Ad5 $\rho$ 2GFP se encontró principalmente en tres compartimientos: soma, proceso axonal y terminal axónica. Para visualizar las diferencias de fluorescencia en los tres compartimientos, se examinó el soma, proceso axonal y terminal axónica en función de la localización e intensidad de fluorescencia. Cada punto de los datos representa la media ( $\pm$ SEM) de 30 experimentos independientes con replica de 3 cada uno. La barra de intensidad de fluorescencia (u.a.f; unidades arbitrarias de fluorescencia), nos permite hacer una comparación directa para definir los dominios de la neurona donde se observa una mayor expresión de  $\rho$ 2GFP (color rojo) y la cual concuerda con la intensidad de expresión del

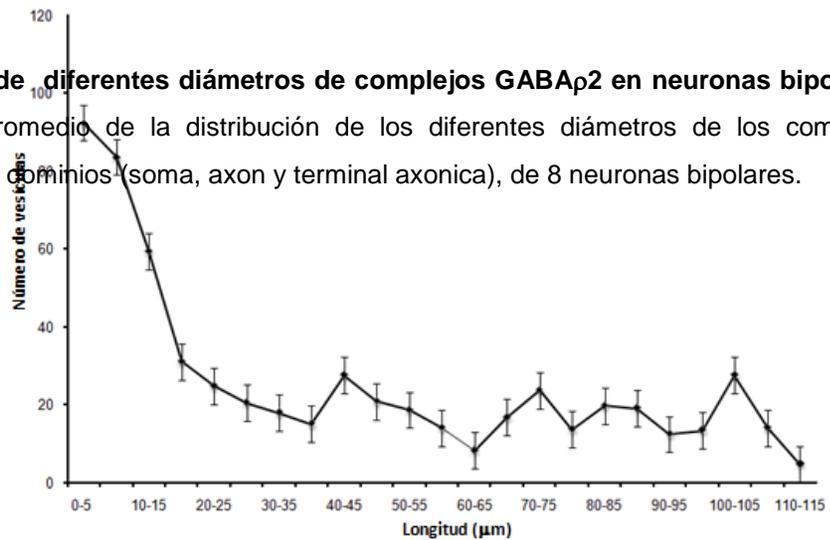
transgen a las 10 horas postinfección. [Barra = 6  $\mu$ m].

Las Figuras 10 y 11, muestran un análisis de la distribución de estos complejos de receptores GABA $\rho$ 2 a lo largo de neuronas bipolares, así como una cuantificación de los diámetros promedio de vesículas (complejos) y su distribución celular.



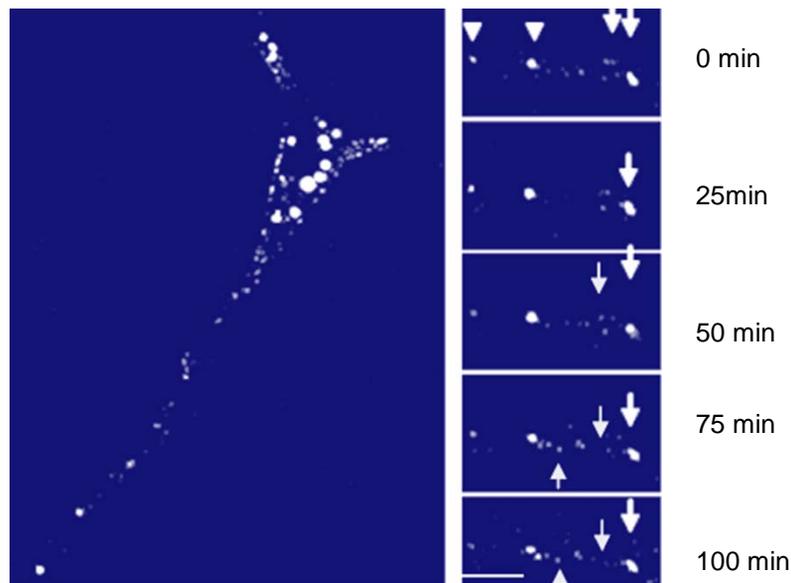
**Figura 10. Distribución de diferentes diámetros de complejos GABA $\rho$ 2 en neuronas bipolares.**

La gráfica muestra el promedio de la distribución de los diferentes diámetros de los complejos GABA $\rho$ 2, a lo largo de los dominios (soma, axon y terminal axónica), de 8 neuronas bipolares.

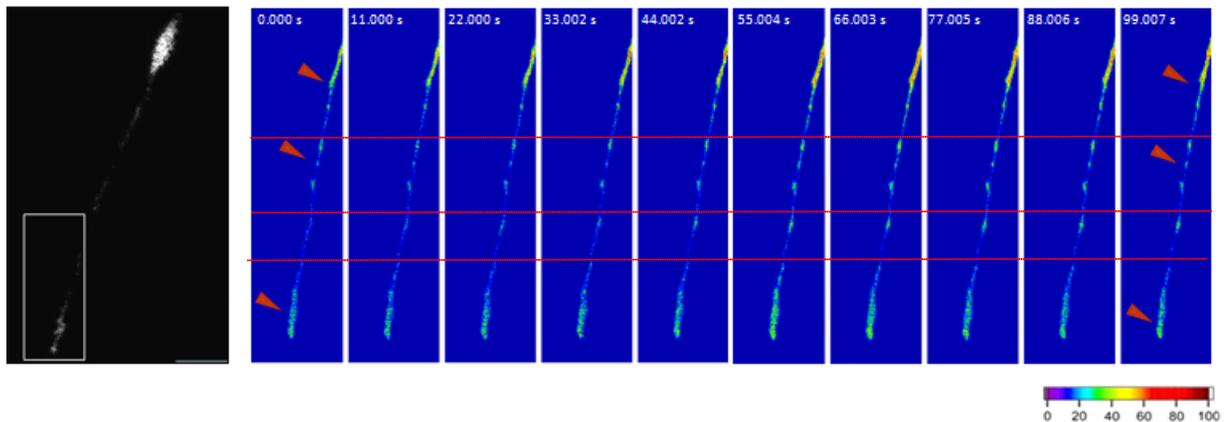


**Figura 11. Distribución de complejos GABA $\rho$ 2 a lo largo de la neurona bipolar.** Cada punto de los datos representa la media ( $\pm$ SEM) de la distancia (longitud neurona bipolar) *versus* número de vesículas GABA $\rho$ 2 (8 neuronas).

El microscopio confocal, nos permitió visualizar el tráfico del receptor con cierta resolución espacial, por lo que el seguimiento fue hecho en diferentes planos focales (cortes ópticos 2  $\mu$ m), comprometiendo la resolución espacial pero preservando la fluorescencia de GFP. Se tomaron imágenes cada 25 minutos, cubriendo todos los planos focales de neuronas bipolares expresando Ad5GABA $\rho$ 2-GFP. Visualizándose complejos  $\rho$ 2-GFP 1) con movimientos aparentemente estocásticos o azarosos en el soma y 2) con direccionamiento hacia y desde la terminal axónica (Figura 12). Observándose fusión de complejos y separación de éstos, para formar nuevos o para moverse independientemente. Así mismo, la resolución temporal de las videograbaciones (100 min), reveló largos periodos de relativa inmovilidad con movimientos azarosos de los complejos localizados en el soma y los cuales presentaron el mayor diámetro (4.5  $\mu$ m).



**Figura 12. Dinámica de los complejos GABA $\rho$ 2-GFP en neuronas bipolares de la retina.** Curso temporal de GABA $\rho$ 2-GFP. La imagen muestra una neurona 6 h después de la infección de GABA $\rho$ 2-GFP. Las puntas de flecha muestran el trazado de vesículas por un periodo de 100 min, las cuales se muestran del lado derecho. Nótese que las vesículas señaladas indican vesículas que permanecían con poco movimiento o movimiento no detectable (cabezas de flecha, izquierda de la imagen). La microfotografía es representativa de 8 experimentos independientes con replica de dos cada uno. [Barra = 10  $\mu$ m].



**Figura 13. Dinámica de los complejos GABA $\rho$ 2-GFP en un solo plano focal.** El rectángulo en el axón corresponde con la zona ampliada y que fue registrada en la serie de imágenes a la derecha. Las imágenes fueron adquiridas cada 11 s. Las cabezas de flecha señalan los complejos de fluorescencia, (GABA $\rho$ 2-GFP). La intensidad de la fluorescencia se representa en unidades arbitrarias, mostrando una mayor intensidad de color rojo. Imagen representativa de 3 experimentos independientes. [Barra = 10  $\mu$ m].

Finalmente, para el segundo conjunto de imágenes de neuronas bipolares expresando GABA $\rho$ 2-GFP, se minimizó la resolución temporal y espacial, por lo que se adquirieron imágenes cada 11 segundos en un solo plano focal del proceso axonal de la neurona bipolar (Figura 13). Las imágenes revelan una gran variabilidad en la dinámica de los complejos GABA- $\rho$ 2GFP, algunos complejos mostraron poca

movilidad, mientras que los más próximos a la terminal axónica presentan un comportamiento relativamente estático.

## IX. Discusión

Los receptores GABA $\rho$  se describieron inicialmente cuando el ARNm de retina de bovino se expresó en ovocitos de *Xenopus laevis* y las corrientes generadas fueron caracterizadas (Polenzani et al. 1991). Actualmente se sabe, que estos receptores muestran una amplia distribución en el SNC. (Albrecht et al., 1997; Boue-Grabot et al., 1998; Enz y Cutting 1999; Johnston 1996; Sivilotti et al. 1991; Wegelius et al. 1998; López-Chávez et al., 2005; Alakuijala et al., 2005; Rosas-Arellano et al., 2005), pero se expresan predominantemente en la terminal presináptica (terminal axónica), de las neuronas bipolares de retina de mamífero, donde los receptores GABA $\rho$  reciben el input GABAérgico de las células amacrinas (Feigenspan et al.,

1993). Esta activación inhibe la liberación del glutamato de las células bipolares hacia las células ganglionares y amacrinas, modulando el rango dinámico, resolución temporal y contraste espacial de la retina en respuesta a estímulos visuales (Dong y Werblin, 1998; Roska et al., 2000; Euler y Masland 2000; Shields et al., 2000; Boue-Grabot et al., 1998; Enz et al., 1995; Enz y Cutting 1999; Wellis y Werblin 1995). Sin embargo, las rutas usadas por los receptores GABA $\rho$  para alcanzar la sinapsis permanecen inciertas. Se sabe que un paso importante en la formación de sinapsis es el reclutamiento y la estabilización de los receptores a neurotransmisores en la membrana y que el tráfico del receptor es crítico para la regulación del proceso de plasticidad sináptica. Por consiguiente, para estudiar el tráfico del receptor GABA $\rho$ 2 en la neurona bipolar de retina, utilizamos la fusión del receptor con GFP (GABA $\rho$ 2-GFP). Esta construcción mostró que la fusión de GFP en el extremo carboxilo terminal del receptor, no compromete el ensamble del receptor o su función y por lo tanto genera una proteína quimérica funcional, con características similares a las del receptor silvestre GABA $\rho$ 2 (López-Chávez et al., 2005; Martínez-Delgado et al., 2010). La correcta orientación del receptor quimérico en la membrana plasmática, se demostró por registros electrofisiológicos en ovocitos (Martínez-Delgado G. 2005 Tesis Maestría) y en células HEK (Martínez-Delgado et al., 2011). En la siguiente fase del proyecto, se implementaron cultivos primarios de retina para visualizar el tráfico de GABA $\rho$ 2-GFP. Sin embargo, las técnicas convencionales de transfección utilizadas para expresar el receptor quimérico en las neuronas bipolares, resultaron ser poco eficientes (lipofectamina, neuroreporter, electroporación y fosfato de calcio). Por lo que se decidió utilizar el adenovirus Ad5, como vector para la expresión de nuestro gen de interés. Inicialmente se mostró que las neuronas en cultivo pueden ser infectadas con el Ad5. Para ello se comparó la eficiencia de expresión dirigida por Ad5-GFP en células de hipocampo y bipolares de la retina. Observamos que el porcentaje de expresión en los dos tipos celulares en cultivo, fue relativamente alta (~90% en hipocampo ~70% en bipolares de la retina). Otros estudios previamente

han demostrado que los adenovirus infectan varios tipos celulares en la retina (Kretz et al., 2003; Cashman et al., 2002; Harvey et al., 2002) y la expresión de GABA $\rho$ 1 se había logrado a través de infección adenoviral en neuronas piramidales de hipocampo (Filippova et al., 2001). En ese trabajo se observó la expresión del adenovirus que porta el cDNA que codifica para GABA $\rho$ 1 el cual no fue transportado hacia su posición perisináptica (Cheng et al., 2001a,b). Cultivos primarios de neuronas de hipocampo y retina fueron infectados con el adenovirus que acarrea el cDN que codifica para GFP (Ad5GFP). Después de la infección con el adenovirus, fue posible la visualización de GFP en estos cultivos. Por lo que el siguiente paso fue el realizar una construcción adenoviral que acarrearé el ADNc de  $\rho$ 2-GFP (Figuras 1, 3-5). Así mismo, se llevó a cabo una serie de experimentos para determinar la identidad de las neuronas bipolares (Figuras 6,7).

Posteriormente se expresó Ad5GABA $\rho$ 2-GFP en cultivos primarios de neuronas bipolares diferenciadas. Después de la infección, la distribución de las neuronas infectadas con Ad5GFP mostró una distribución homogénea (Figura 2) y una distribución heterogénea y no uniforme de Ad5 $\rho$ 2-GFP (Figura 8,9). Esta distribución diferencial de GABA $\rho$ 2-GFP en los diferentes dominios de la neurona bipolar fueron cuantificados en unidades arbitrarias de fluorescencia (Figura 9) Posteriormente, con este sistema de expresión de  $\rho$ 2-GFP, estudios de imagen en neuronas vivas fueron inicializados a 37°C, ya que se sabe que el cambio de temperatura de entre 10-15 °C induce cambios en el coeficiente de difusión de la proteína en la membrana plasmática de aproximadamente 2 veces (Tardin et al 2003). Por consiguiente todas las imágenes fueron tomadas a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> con periodos de toma de captura cortos (delimitado por el blanqueamiento del fluoróforo). Así mismo, para identificar una ventana de tiempo de visualización después de la infección, se empezó a caracterizar la cinética de expresión. La fluorescencia inicialmente fue óptima entre ~6-10 horas. En horas posteriores, la fluorescencia

incrementó a lo largo de la célula. Esto pudo ser un artefacto por el promotor fuerte e inespecífico del cytomegalovirus (CMV) utilizado en esta construcción. Pero hasta el momento, no existe evidencia acerca de un promotor que dirija a los receptores GABA $\rho$ . Actualmente nuestro grupo está trabajando en identificar a este promotor y en el futuro el también hacer construcciones virales GABA $\rho$  reguladas por el promotor específico de neuronas que es sinapsina-1; el cual ha mostrado ser eficiente en la expresión específica de neuronas hipocampo en una mezcla de cultivos. Esto, como promotor control neura-específico (Sims et al., 2008).

En tiempos tempranos después de la infección (6-10 h) fue posible observar complejos  $\rho$ 2GFP (Figura 8). Estos complejos fueron analizados y cuantificados en los diferentes dominios de la neurona bipolar (Figura 9-11), como por el número de vesículas/complejos GABA $\rho$ 2-GFP (Figura 12), a lo largo de la neurona bipolar. Los complejos de mayor diámetro (4.5  $\mu$ m), fueron localizados principalmente en el soma, en comparación con los complejos de menor diámetro (0.5  $\mu$ m), los cuales fueron localizados a lo largo de la neurona bipolar. Siendo los diámetros similares a los reportados para los receptores de glutamato y los receptores de acetilcolina (Murata et al., 1998; Pakkanen et al., 2006).

Posteriormente empleamos microscopía confocal para capturar sucesiones de imágenes con una resolución temporal lo suficientemente alta para determinar la localización y movilidad de los complejos  $\rho$ 2GFP. La movilidad de los complejos  $\rho$ 2GFP fueron bidireccionales y en muchos casos el complejo permaneció estático principalmente en el soma (Figura 13), siendo evidente mayor movilidad de estos complejos en la prolongación axónica y terminal axónica (Figura 13). Estos resultados indican que los movimientos de  $\rho$ 2GFP son rápidos en el dominio terminal del axón. Las imágenes revelaron la expresión de  $\rho$ 2GFP en la superficie de la célula así como dentro de las numerosas estructuras citoplasmáticas (Figura 12). Observándose

complejos GABA- $\rho$ 2GFP de tamaño variado y forma (diámetros  $\sim$ 0.3–4.0  $\mu$ m) y mostrando una asociación y disociación tanto direccionada y estocástica en los movimientos de los complejos GABA $\rho$ 2-GFP.

Estos resultados podrían sugerir una correlación directa, con la noción de que los complejos de menor tamaño presentaron mayor movilidad. Pero, ¿por qué se observan complejos  $\rho$ 2-GFP de diferentes tamaños en el soma *versus* terminal axónica donde el receptor se ancla y ejerce su función? Está bien documentado que los receptores se sintetizan en el soma donde se trasladan a regiones distales (Chen et al., 2007). Esto puede ocurrir a través de dos mecanismos: a) difusión lateral a lo largo de la membrana plasmática (Choquet y Triller, 2003); o b) por transporte a través de la red de microtúbulos, seguido de la inserción directa del receptor hacia la superficie (Chen et al., 2007). Por lo que se podría especular de la existencia de un tipo de reservorio local del receptor. En vista de nuestros resultados y para clarificar algunos aspectos de la movilidad del complejo se minimizó la resolución espacial y temporal de la toma de imágenes, la cual se realizó cada 9.5 s y en un solo plano focal. De esta manera se observó que algunos complejos se localizaban cercanos y/o en la membrana plasmática y posteriormente salían del plano focal, mientras otros permanecían inmóviles (3 neuronas). Los complejos más distales (localizados en la terminal axónica), mostraron una dinámica mucho mayor en comparación con los localizados en regiones proximales (prolongación axónica y soma). Pero siempre la movilidad de los complejos tanto en la prolongación axónica como en la terminal fueron multidireccionales (retrógrado-anterógrado) y en ocasiones progresión hacia la membrana (Figura 13). Sin embargo, se requerirá de una resolución temporal mucho mayor para poder determinar la velocidad promedio de los complejos que viajan hacia y a través de la terminal axónica y con ello, se podrá hacer una comparación directa de los datos reportados de otros neuroreceptores.

A la luz de estos resultados, la expresión de GABA $\rho$ 2GFP se llevó a cabo en un ambiente *in vitro* en neuronas bipolares. El monitoreo de estos complejos GABA $\rho$ 2 por microscopia confocal permitió determinar que estos complejos parecen tomar pausas, lo cual podría sugerir que pueden estar interactuando recíprocamente con proteínas que se encuentran en o cerca de la membrana plasmática y que tales interacciones transitorias pueden ser parte del mecanismo de anclaje de GABA $\rho$ 2. Por lo que podría sugerirse que, si una población significativa de subunidades  $\rho$ 2 está asociada a los microtúbulos y estas subunidades pueden ser transportadas por estos motores moleculares, entonces se esperaría que el transporte del receptor sea interrumpido utilizando drogas que interfieran con la polimerización de microtúbulos. Por otra parte, la exploración de un mecanismo molecular de regulación por la localización del mRNA será de gran interés, porque la posibilidad de síntesis local de la proteína GABA $\rho$ 2 como un mecanismo de anclaje y tráfico ha sido explorada en neuronas de hipocampo (Horton y Ehlers, 2003; et Giuditta et al., 2002). De acuerdo a los diferentes modelos utilizados en este estudio, la expresión y tráfico de  $\rho$ 2GFP se realiza en complejos intracelulares. Alternativamente, es posible que las subunidades maduren pero permanezcan intracelulares hasta la "señalización de salida" (como se describe en el tráfico de proteínas; Kandel et al., 2007) y de esta manera estar activándose su transporte, aunque es de mencionar que existe la posibilidad que la acumulación de estos complejos pudiera ser meramente un artefacto de sobreexpresión y esto tampoco puede ser descartado. Por consiguiente, será importante en una investigación futura clarificar este dilema. Además será necesaria una comprensión más amplia de las interacciones proteína-proteína y de procesos de señalización que son requeridos por los receptores GABA $\rho$  para entender el mecanismo molecular de la plasticidad neuronal subyacente.

Estudios previos han demostrado que la localización de los canales iónicos puede ser dependiente del citoesqueleto (Tamkun et al 2007), ya que se encuentra

involucrado en eventos celulares que incluyen el tráfico de membrana, tal como la endocitosis y exocitosis (Apodaca G. 2001). También, se ha descrito que la actina, puede jugar un papel importante en el mantenimiento del agregado de receptores (O'Connell et al., 2006). Así mismo, se ha descrito que la función de canales iónicos no solo determina la propiedad de la excitabilidad celular, sino que ésta viene dada también, por la correcta localización del canal. Esta localización precisa de los canales iónicos puede influenciar el potencial de membrana local (Frick et al., 2004). Sin embargo, este tipo de estudios no han sido descritos para los receptores GABA $\rho$ , incluyendo el mecanismo de su tráfico y anclaje en la membrana.

En resumen, la localización de los receptores a neurotransmisores está sujeta a regulación en el tiempo y depende de excitabilidad celular y la correcta localización del canal. Pero, cómo es que los receptores GABA $\rho$  recién sintetizados, se incorporan a las terminaciones sinápticas es aún poco entendido. Los receptores clásicos GABAA no se insertan directamente en la membrana sináptica sino que se incorporan primero, en la membrana juxta-sinápticamente y luego por difusión lateral llegan a su localización sináptica final (Bogdanov et al., 2006; Jacob et al., 2008). Por lo que queda por determinarse si los receptores GABA $\rho$  siguen vías alternativas hasta anclarse a su terminal sináptica, lo que servirá para realizar futuras investigaciones acerca del tráfico del receptor en tiempo real y la posible visualización de vías de participación en procesos fisiológicos o patológicos *in vivo* que involucran a los receptores GABA.

## X. Conclusión

La habilidad de infectar neuronas bipolares con Ad5GABA $\rho$ 2-GFP nos permitió describir el tráfico del receptor GABA $\rho$ 2 en la neurona bipolar de la retina. Se observaron claras diferencias entre el tamaño medio de las agrupaciones que se encuentran en el soma (~4.5  $\mu$ m) y los que viajan desde y hacia el axón (~0.5  $\mu$ m). La dinámica de estos grupos también fue muy diversa, mientras que los grupos de mayor diámetro localizados en el soma no presentaron movilidad perceptible, las trayectorias seguidas por las pequeñas partículas localizadas a lo largo del axón y el proceso axonal fue de un par de micrómetros de movilidad, en los periodos de observación.

## XI. Referencias

- Anzai K, Yoneya S, Gehlbach PL. (2005). Laser photocoagulation and, to a lesser extent, photodynamic therapy target and enhance adenovirus vector-mediated gene transfer in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46: 3883–3891
- Arancibia-Cárcamo IL, Yuen EY, Muir MJ, Lumb MJ, Michels G, Saliba RS, Smart TG, Yan Z, Kittler JT, Moss SJ. (2009) Ubiquitin-dependent lysosomal targeting of GABA(A) receptors regulates neuronal inhibition. *Proc. Natl. Acad Sci.* 106, 17552-7
- Beattie, E.C. et al. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat. Neurosci.* 3, 1291–1300
- Boyer SB, Clancy SM, Terunuma M, Revilla-Sanchez R, Thomas SM, Moss SJ, Slesinger PA. (2009). Direct interaction of GABAB receptors with M2 muscarinic receptors enhances muscarinic signaling. *J Neurosci.* 29, 15796-809.
- Borgdorff AJ, Choquet D. Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature.* 2002;417(6889):649–653.
- Carroll, R.C., Beattie, E.C., von Zastrow, M. & Malenka, R.C. (2001). Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 315–324.
- Carroll, R.C. et al. (1999). Dynamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 14112–14117
- Carter, R. E. & Sorkin, A. (1998). Endocytosis of functional epidermal growth factor receptor–green fluorescent protein chimera. *J. Biol. Chem.* 273: 35000–35007
- Cashman SM, Sadowski SL, Morris DJ, Frederick J, Kumar-Singh R. (2002). Intercellular trafficking of adenovirus-delivered HSV VP22 from the retinal pigment epithelium to the photoreceptors--implications for gene therapy. *Mol Ther.* 6(6):813-23
- Catsicas M y Mobbs P (2001) GABA<sub>B</sub> Receptors Regulate Chick Retinal Calcium Waves. *J Neurosci.* 21(3):897-910
- Chalfie, M. y Kain, S. Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols (1998). New York. Wiley-Liss
- Chalfie M, Tu U, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263:802– 805; Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. (1995) Understanding, improving, and using green fluorescent protein. *Trends Biochem Sci.* 20:448–455.
- Chartier E, Degryse M, Gantzer A, Dieterle´ A, Pavirani and Mehtali M. (1996) Efficient Generation of Recombinant Adenovirus Vectors by Homologous Recombination in Escherichia coli. *J. Virol.* 70:4805-4810

- Cheng Q, Burkat PM, Kulli JC, Yang J. (2001a). GABA(C) rho(1) subunits form functional receptors but not functional synapses in hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 86(5):2605-15.
- Cheng Q, Kulli JC, Yang J. (2001b). Suppression of neuronal hyperexcitability and associated delayed neuronal death by adenoviral expression of GABA(C) receptors. *J Neurosci.* 21(10):3419-28.
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. (1995) Understanding, improving, and using green fluorescent protein. *Trends Biochem Sci.* 20:448–455.
- Choquet D, Triller A. (2003). The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci.* 4(4):251–265.
- Dutton J. L., Poronnik P., Li, G. H. Holding C. A., Worthington, R. A. Vandenberg, R. J. Cook, D. I., Barden J. A. and Bennett M. R. (2000). P2X<sub>1</sub> receptor membrane redistribution and down-regulation visualized by using receptor-coupled green fluorescent protein chimeras. *Neuropharmacology* 39:2054-2066.
- Enz, R., Brandstatter, J. H., Hartveit, E., Wässle, H. & Bormann, J. Expression of GABA receptor rho1 and rho2 subunits in the retina and brain of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1495±1501 (1995).
- Euler T, Wässle H. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 1995; 361: 461- 478.
- Feigenspan, A., and J. Bormann. (1994). Modulation of GABAC receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C. *J. Physiol.(Lond.)* 481: 325–330.
- Feigenspan, A., H. Wässle, and J. Bormann (1993) Pharmacology of GABA receptor Cl<sub>2</sub> channels in rat retinal bipolar cells. *Nature* 361: 159–162.
- Filippova N, Dudley R. Weiss DS. (1999) Evidence for phosphorylation-dependent internalization of recombinant human  $\rho$ 1 GABAC. *J Physiol* 518(Pt 2):385-99
- Giuditta A., Kaplan B., Minnen J., Alvarez J. and Koenig E. (2002). Axonal and presynaptic protein synthesis: new insights into the biology of the neuron. *TRENDS Neurosci.* 25(8):400-4004
- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci.* 2004;7:695–696.
- Guan, J.S. et al. (2005). Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell* 122, 619–631
- Harvey AR, Kamphuis W, Eggers R, Symons NA, Blits B, Niclou S, Boer GJ, Verhaagen J. (2002). Intravitreal injection of adeno-associated viral vectors results in the transduction of different types of retinal neurons in neonatal and adult rats: a comparison with lentiviral vectors. *Mol Cell Neurosci.* 21(1):141-57.

He TC, Zhou SB, da Costa LT, Yu Y, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**: 2509-2514.

Hirt MM. (1967) Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell culture. *J. Mol. Bio.* 26:365-369.

Horton A. and Ehlers M. (2003). Dual Modes of Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Transport in Dendrites Revealed by Live-Cell Imaging. *J Neurosci.* 23(15):6188–6199

Hu, C. Kerppola, T. (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interaction in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nature Biotech.* 21, 539-545

Ivic L, Zhang C, Zhang X, Yoon SO, Firestein S. (2002). Intracellular trafficking of a tagged and functional mammalian olfactory receptor. *J. Neurobiol.* 50(1):56-68

Jones SM, Palmer MJ. 2009. Activation of the tonic GABAC receptor current in retinal bipolar cell terminals by nonvesicular GABA release. *J Neurophysiol* 102(2):691-9.

Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. GABA<sub>A</sub> receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 2008; **9**: 331- 343.

Johnston, G.A., Curtis, D.R., Beart, P.M., Game, C.J., McCulloch, R.M., Twitchin, B. Cis- and trans-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation. *J. Neurochem.*, 1975, 24, 157-160

Jost B, Grabert J, Patz S, Schmidt M, Wahle P. (2006). GABAC receptor subunit mRNA expression in the rat superior colliculus is regulated by calcium channels, neurotrophins, and GABAC receptor activity. *Brain Cell Biol.* 35(4-6):251-66

Kandel, E. R., Schwartz, J., Jessel, T. Principles of Neural Science. USA, McGraw-Hill Companies, Inc, 2000.

Keith, D.E. et al. (1998). mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain. *Mol. Pharmacol.* 53, 377–384.

Kim, K.A. & von Zastrow, M. (2003). Neurotrophin-regulated sorting of opioid receptors in the biosynthetic pathway of neurosecretory cells. *J. Neurosci.* 23, 2075–2085.

Kretz A, Wybraniec WA, Hermening S, Lauer UM, Isenmann S. (2003). HSV-1 VP22 augments adenoviral gene transfer to CNS neurons in the retina and striatum in vivo. *Mol Ther.* 7(5 Pt 1):659-69

Ko Matsui, Jun Hasegawa, and Masao Tachibana. (2001). Modulation of Excitatory Synaptic Transmission by GABA<sub>C</sub> Receptor-Mediated Feedback in the Mouse Inner Retina. *J Neurophysiol* 86: 2285-2298

Koulen P, Brandstätter JH, Enz R, Bormann J, Wässle H.(1998) Synaptic clustering of GABA(C) receptor rho-subunits in the rat retina. *Eur J Neurosci.* (1):115–127.

Krnjević, K. (1974). Chemical Nature of Synaptic Transmission in Vertebrates. *Physiol Rev.* 54: 418-540

- Iino M., Goto K., Kakegawa W., Okado H., Sudo M., Ishiuchi S., Miwa A., Takayasu Y., Saito I., Tsuzuki K., Ozawa S. (2001). Glia-Synapse Interaction Through Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPA Receptors in Bergmann Glia. *Science* 292 (5518): 926-929
- Lopez-Chavez A, Miledi R, Martinez-Torres A. (2005) Cloning and functional expression of the bovine GABA(C) ρ2 subunit Molecular evidence of a widespread distribution in the CNS. *Neurosci Res* 53:421-7.
- Malenka, R.C. (2003)..The long-term potential of LTP. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 923–926.
- Malinow, R. & Malenka, R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103–126. 4.
- Martínez-Delgado G. (2003) Construcción y caracterización funcional del receptor quimérico GABA<sub>ρ2</sub>-GFP. MsC. INB-UNAM
- Martinez-Torres A, Miledi R. (2001) Expression of γ-aminobutyric acid ρ1 and ρ1 Δ450 as gene fusions with the green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci* 13;98(4):1947-51.
- McConnell MJ, Imperiale MJ. (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 15:1022–1033. DOI: 10.1089/1 043 034 042 431 119
- Meixner A., Haverkamp S., Wässle H., Führer S., Thalhammer J., Kropf N., Bittner R., Lassmann H., Wiche G., Propst F. (2000). MAP1B Is Required for Axon Guidance and Is Involved in the Development of the Central and Peripheral Nervous System. *J Cell Biol* 151:1169-1178.
- Miledi R (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc London Ser B* 1982; **215**: 491– 497.
- Miyawaki, A., Sawano, A. y Kogure, T. (2003). Ligthing up cells: labeling proteins with fluorophores. *Imaging Cell Biol.* S1-S14
- Lee M, Schwab C, McGeer PL. (2010). Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia*. [Epub ahead of print]
- Lee M, Schwab C, McGeer PL. (2011) Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia*.59(1):152-65.
- Mori K, Gehlbach P, Ando A, (2002). Intraocular adenoviral vector mediated gene transfer in proliferative retinopathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* .46: 3883–3891
- Murata Y,Woodward RM, Miledi R, Overman LE. The first selective antagonist for a GABAC receptor. *Biomed Chem Lett* 1998; 17:2073–2076.
- Mohrlüder J, Schwarten M, Willbold D. 2009. Structure and potential function of gamma-aminobutyrate type A receptor-associated protein. *FEBS J.* 276(18):4989-5005.
- Nicoll, R.A. & Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 863–876.
- Negishi K, Kato S, Teranishi T. 1988. Dopamine cells and rod bipolar cells contain protein kinase C-like immunoreactivity in some vertebrate retinas. *Neurosci Lett.* 4(3):247-52.

- O'Connell KM, Rolig AS, Whitesell JD, and Tamkun MM. (2006) Kv2.1 potassium channels are retained within dynamic cell surface microdomains that are defined by a perimeter fence. *J Neurosci* 26: 9609-9618.
- Osborne KD, Lee W, Malarkey EB, Irving AJ, Parpura V. Dynamic imaging of cannabinoid receptor 1 vesicular trafficking in cultured astrocytes. *ASN Neuro* 2009; 1: 283-296.
- Palma, E., Mileo, A., Martínez, A., Eusebi, F. Y Miledi, R. (2001). Some properties of human neuronal  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors fused to the green fluorescen protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 3950-3955
- Pakkanen JS, Stenfors J, Jokitalo E, Tuominen RK. (2006). Effect of chronic nicotine treatment on localization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors at cellular level. *Synapse*. 1;59(7):383-93.
- Pérez-Velázquez J and Angelides KL (1993). Assembly of GABA-A receptor subunits determines sorting and localization in polarized cells. *Nature*. 361:457-460.
- Pielage J, Fetter R, Davis W. A postsynaptic Spectrin scaffold defines active zone size, spacing, and efficacy at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Cell Biol* 2006; 175: 491-503
- Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. Expression of mammalian g-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 4318-4322.
- Qian, H. (2010). The unique pharmacology and kinetics of GABAC receptors. Ed David. Weiss
- Sagdullaev BT, McCall MA, Lukasiewicz PD. Presynaptic inhibition modulates spillover, creating distinct dynamic response ranges of sensory output. *Neuron* 2006; 50: 923- 935.
- Scannevin, R.H. & Huganir, R.L. (2000). Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 133–141. 2.
- Serge A, Fourgeaud L, Hemar A, Choquet D. Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *J Neurosci.* 2002;22:3910–3920.
- Sheng, M. & Kim, M.J. (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298, 776–780.
- Shenk, T., 1996, Adenoviridae: The viruses and their replication in: Field Virology third edition, (B.N. Fields *et al.* eds), pp 2111–2148, Lippincot-Raven Publisher, Philadelphia.
- Shi, S.H. et al. (1999). Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284, 1811–1816
- Sims K., Ahmed Z., Gonzalez A., Read M., Cooper-Charles L., Berry M. and Logan A. (2008). Targeting adenoviral transgene expression to neurons. *Mol. Cell. Neuros.*

Song, I. & Huganir, R.L. (2002). Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 578–588.

Sorkin, A. & Von Zastrow, M. (2002). Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 600–614.

Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D. Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *EMBO J.* 2003;22(18):4656–4665.

Tweelvetrees AE, Yuen EY, Arancibia-Cárcamo IL, MacAskill AF, Rostaing P, Lumb MJ *et al.* Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant Huntingtin. *Neuron* 2010; **65**: 53-65.

Tovar KR, Westbrook GL. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses *in vitro*. *J Neurosci.* 1999;19:4180–4188

Tamkun MM, O'Connell K M, and Rolig AS. (2007) A cytoskeletal-based perimeter fence selectively corrals a sub-population of cell surface Kv2.1 channels. *J Cell Sci* 120: 2413-2423.

Vaquero CF, de la Villa P. Localisation of the GABA $\rho$  receptors at the axon terminal of the rod bipolar cells of the mouse retina. *Neurosci Res* 1999; 35: 1- 7.

Verkhratsky A, Steinhauser C. (2000). Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev* 32:380–412.

Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H. (1998). Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78:99–141.

Watanabe T, Voyvodic JT, Chan-Ling T, Sagara H, Hirosawa K, Mio Y *et al.* Differentiation and morphogenesis in pellet cultures of developing rat retinal cells. *J Comp Neurol* 1997; **3**: 341- 350.

Whistler, J.L. & von Zastrow, M. (1998). Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 9914–9919

Yasumi, M., K. Sato, et al. (1997). Regional distribution of GABA transporter 1 (GAT1) mRNA in the rat brain: Comparison with glutamic acid decarboxylase $_{67}$  (GAD $_{67}$ ) mRNA localization. *Mol Brain Res* 44: 205-218.

## APÉNDICE A

### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA SALINA –FOSFATOS 10X (PBS)

80 g de NaCl (Sigma)

2 g de KCl (Sigma)

14.4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma)

2.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. (Sigma)

Se agrega H<sub>2</sub>O destilada, se ajusta el pH a 7.4 y se afora a 1000 ml. Se filtra y se guarda a temperatura ambiente.

### PARAFORMALDEHIDO 4 %

Paraformaldehido (Sigma )

0.4 g de paraformaldehido

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

Se afora a 10 ml con PBS 1X.

### H<sub>2</sub>O DEPC

Agregar 1 ml de dietilpirocarbonato (DEPC) a 1000 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada

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

Esterilizar en autoclave a 120°C por 20 minutos

Almacenar a temperatura ambiente

### Solución D

Disolver 125 g de isotiocianato de guanidina en 146.5 ml de H<sub>2</sub>O DEPC

Calentar 65°C

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

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

### **Medio LB líquido**

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

Colocar en autoclave a 120°C por 20 minutos.

Almacenar a 4°C o a -20°C.

### **Cajas de Petri con medio**

#### **LB-Agar 2%**

25 g de LB por cada litro de solución.

Adicionar 20 g de agar por cada litro de solución.

Colocar en autoclave a 120°C por 20 minutos.

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

Vaciar el contenido en cajas de Petri.

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

### **Antibióticos**

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

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

## APÉNDICE B

### **Cultivo primario de hipocampo de rata (Loeffler 1990)**

- Disecación hipocampo ratas 9 días postnatales
- Hipocampo se conserva en sol Hanks
- Se lavan los hipocampos 2 veces con 500 ul de sol Hanks+papaína (0.015%) + L-cisteína (2mM)+EGTA (2.5 mM) El tejido se reparte en 2 cajas Petri de 35 mm el medio de lavado retirado.
- Se lava dos veces con 500 ul de papaína (.015%) + L-cisteína (2mM)+ EGTA 2.5 M.
- Se retira el medio e incuba por 30 min con 1ml de sol de papaína + L-cisteína+EGA a 37 C
- Se retira el medio y agrega a cada caja 1ml de medio DMEM 1X+BSA 1%+N2 1X+ Dnasa (0.2%) se lava una sola vez
- Se lava dos veces con DMEM 1X +SFB 10%+gentamicina 10 mg/ml. Se retira el medio
- Se agregan 2ml de DEMEM 1X+SFB10%+ genta a cada caja. Se homogeniza el tejido pasando por pipetas de 20 a 1000
- Las cajas se lavan una vez con 3 ml de sol DMEM 1X + HEPES\*SFB 10%+genta. – (Esta sol de lavado se agrega al tubo 50 ml de esta manera se obtiene un volumen final de 10 ml de células disgregadas), se mezcla y reparte en cajas Petri de 35 mm. -
- Se cambió el medio después de 16 h por DMEM 1X +N2 +genta cada 72 h.
- El medio de cultivo con antibiótico fue reemplazado con medio nuevo hasta 48 h antes de ser utilizados