



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PROGRAMA DE POSGRADO
EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**“MODULACIÓN DEL RECEPTOR DE GLICINA POR
PROTEÍNAS CINASAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIÓL. MIGUEL ÁNGEL VELÁZQUEZ FLORES

TUTORA:

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

México, D.F.

2011.



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.

**Jump, and you will find out how
to unfold your wings as you fall.**

Ray Bradbury

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
ANTECEDENTES.....	4
I. Estructura del Receptor Post-sináptico de glicina (RGly)	
A. Sitios de unión de glicina y estricnina al RGly.....	6
a. Agonistas del RGly.....	7
i. El alcaloide estricnina.....	9
B. Segmentos transmembranales del RGly	
a. Segmento TM1.....	12
b. Segmento TM2.....	13
c. Segmento TM3.....	14
d. Segmento TM4.....	15
C. Asa intracelular del RGly.....	15
II. Dominios de Regulación Intracelular del RGly	
A. Dominio de Ubiquitinación.....	16
B. Sitios SH3.....	17
C. Fosforilación.....	17
a. Regulación por proteínas de tipo tirosina cinasa.....	17
b. Proteínas cinasas A y C.....	18
Artículo de revisión: “Modulación de los Receptores Ionotrópicos de tipo “Cys-Loop” por proteincinasas A y C”.	
III. Mecanismos de Regulación Cruzada “cross-talk”.....	19
A. Desensibilización homóloga.....	19
B. Desensibilización heteróloga.....	20

IV. La retina de los vertebrados.....	21
A. Respuestas ON y OFF en la retina.....	21
a. Campo receptivo de las células ganglionares de la retina.....	23
i. Campo receptivo central y periférico.....	25
B. Transmisión glicinérgica en la retina.....	27
a. La estricnina: antagonista de la transmisión glicinérgica.....	29
b. Ratones transgénicos.....	31
V. Localización del RGly en la retina.....	32
JUSTIFICACIÓN.....	35
HIPÓTESIS.....	36
OBJETIVO.....	36
OBJETIVOS PARTICULARES.....	36
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	37
1. Ensayo de Unión de Ligandos Radioactivos.....	37
2. Efecto de las Proteínas Cinasas sobre la Unión Específica.....	37
3. Inmunoprecipitación.....	38
4. Fraccionamiento Subcelular.....	39
RESULTADOS.....	42
A. Glycine Receptor Internalization by Protein Kinases Activation	
RESULTADOS NO PUBLICADOS.....	43
1. Unión Específica de [³ H]glicina y [³ H]estricnina al RGly.....	43
2. Fosforilación del RGly por Glicina.....	45
3. Posible Regulación Cruzada del RGly.....	45
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	54
PERSPECTIVAS.....	55

ABREVIATURAS

AMPc. Adenosina monofosfato cíclico

B_{MAX}. Número máximo de sitios de unión

Cyt D. Citocalasina D

GABA. Ácido γ -aminobutírico

k_D. Constante de afinidad

n_H. Coeficiente de Hill

NMDA. N-metil-D-aspartato

PKA. Proteína cinasa A

PKC. Proteína cinasa C

PMA. Forbol 12-acetato 13-miristato

RAPG. Receptores acoplados a proteínas G

RGABA_A. Receptor ionotrópico de GABA de tipo A

RGABA_{A-p}. Receptor ionotrópico de GABA de tipo A-p

RGly. Receptor post-sináptico de glicina

RIAL. Receptores ionotrópicos activados por ligando

sIPSCs. Corrientes postsinápticas inhibitoras espontáneas

RESUMEN

En el sistema nervioso se demostró que las corrientes producidas por glicina son moduladas por las proteínas cinasas A (PKA) y C (PKC), sin embargo el mecanismo de acción se desconoce. Con el propósito de entender el mecanismo involucrado en este fenómeno, estudiamos el efecto que tiene la activación de la PKA y PKC sobre la unión específica de ^3H -glicina y ^3H -estricnina al receptor post-sináptico de glicina (RGly) en la retina aislada de la rata. La unión específica de los radioligandos representó alrededor del 20% de la unión total. El análisis cinético de la unión específica exhibió un comportamiento de tipo sigmoide con tres sitios de unión de glicina ($K_D = 212 \text{ nM}$) y dos de estricnina ($K_D = 50 \text{ nM}$). La unión específica de ^3H -glicina y ^3H -estricnina disminuyó (60-85%) en respuesta a la activación de la PKA o PKC, efecto que se bloqueó en presencia de inhibidores específicos, así como por la citocalasina D (Cyt D). Asimismo, el RGly localizado en la superficie celular disminuyó en un 50% en respuesta a la activación de estas cinasas, coincidiendo con el incremento observado en la fracción microsomal cuando se activó la PKA. Adicionalmente, estudios de inmunoprecipitación demostraron que la activación de estas cinasas lleva a un aumento en los niveles de fosforilación del receptor. Nuestros resultados sugieren que en la retina, el RGly se regula por una intercomunicación mediada por receptores acoplados a proteínas G (RAPG) que activan a la PKA o PKC.

Palabras clave: Receptor de glicina. Ensayo de unión de ligandos radioactivos. Fosforilación del RGly. Internalización de receptores ionotrópicos. Regulación heteróloga de receptores.

ABSTRACT

Although glycine-induced currents in the central nervous system have been proven to be modulated by protein kinases A (PKA) and C (PKC), the mechanism is not well understood. In order to better comprehend the mechanism involved in this phenomenon, we tested the effect of PKA and PKC activation on the specific [³H]glycine and [³H]strychnine binding to post-synaptic glycine receptor (GlyR) in intact rat retina. The specific binding constituted about 20% of the total radioligand binding. Kinetic analysis of the specific binding exhibited sigmoidal behavior with three glycine and two strychnine binding sites and affinities of 212 nM for [³H]glycine and 50 nM for [³H]strychnine. Specific radioligand binding was decreased (60-85%) by PKA and PKC activation, an effect that was blocked by specific kinases inhibitors as well as by cytochalasin D. GlyR expressed in the plasma membrane decreased about 50% in response to kinases activation, which was consistent with an increase of the receptor in the microsomal fraction when PKA was activated. Moreover, immunoprecipitation studies indicated that these kinases lead to a time-dependent receptor phosphorylation. Our results suggest that in retina, GlyR is cross-regulated by G-protein-coupled receptors, activating PKA and PKC.

Keywords: Cys-loop glycine receptor, radioligand binding assay, glycine receptor phosphorylation, ionotropic receptor internalization, receptor cross-talk.

ANTECEDENTES

En 1970, Aprison y Werman demostraron que la glicina funciona como neurotransmisor inhibitor en la médula espinal, con base en lo que ellos llamaron el “criterio presináptico”: a) identificar la presencia de glicina en la neurona presináptica (Graham y Aprison, 1966; Aprison y Werman, 1965b; Graham et al., 1967; Johnston, 1968), b) liberación de la molécula después de un estímulo despolarizante (Aprison, 1970a, b; Roberts y Mitchell, 1972) y c) reproducción del efecto electrofisiológico en respuesta a la liberación de glicina (Werman et al., 1967, 1968; Curtis et al., 1968). Adicionalmente, otros criterios que se toman en cuenta para determinar la función de una molécula como neurotransmisor, es la presencia de un mecanismo que la elimine del espacio sináptico y de un receptor postsináptico que medie su acción. En este sentido, en preparaciones de la médula espinal, se demostró la presencia de un sistema de captura para [¹⁴C] glicina (Johnston e Iversen, 1971; Logan y Snyder, 1972) que la elimina del espacio sináptico, así como la presencia de un receptor postsináptico de glicina que media su acción (Young y Snyder, 1973, 1974; Betz et al. 1986; Betz y Becker, 1988).

La investigación sobre la neurotransmisión glicinérgica en la médula espinal desembocó en la caracterización minuciosa de su receptor post-sináptico (RGly), el cual es uno de los representantes arquetípicos del grupo de los receptores ionotrópicos activados por ligando (RIAL) de tipo “cys-loop” (TCL): receptor nicotínico de acetilcolina (RnACh), del ácido γ -aminobutírico (GABA) de tipo A (RGABA_A) y A- ρ (RGABA_{A- ρ}), serotonina (R5-HT₃) y zinc (ZAC) (Tabla I). La

utilización de la estricnina como la molécula con mayor afinidad por el RGly, permitió su purificación de la médula espinal a través de cromatografía de afinidad en columnas de agarosa acopladas a NH₂-estricnina. La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras, reveló la presencia de dos subunidades: 48 kDa (α), 58 kDa (β) y de la proteína periférica de membrana gefirina que ancla al citoesqueleto al receptor (93 kDa) (Pfeiffer et al., 1982). Originalmente, experimentos de entrecruzamiento químico, “cross-linking”, en RGlys purificados de la médula espinal, indicaron una estequiometría de $3\alpha : 2\beta$ (Langosch et al., 1988). Sin embargo, un estudio reciente a partir de RGlys recombinantes, utilizando la co-expresión de las subunidades α ó β silvestres con una construcción en tándem α/β , reveló una estequiometría de $2\alpha : 3\beta$ (Fig. 1) (Grudzinska et al., 2005). Hasta el momento, se han identificado cuatro genes que codifican para distintas isoformas de la subunidad α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) y un solo gen que lo hace para la β . La combinación de las distintas isoformas de la subunidad α con la β , tiene como resultado la expresión de diferentes receptores con propiedades específicas cada uno (Kuhse et al., 1990; Mangin et al., 2003; Mohammadi et al., 2003; Miller et al., 2004).

I. Estructura del RGly

La mayoría de las características estructurales del RGly se han deducido a partir de su homología con el receptor nicotínico de la acetilcolina (RnACh). Los receptores TCL contienen cinco subunidades que se disponen asimétricamente para formar el canal. La característica que define a los miembros de esta familia,

es la presencia de dos cisteínas altamente conservadas que forman un asa en la región NH₂-terminal que contiene el sitio de unión a glicina, así como la presencia de cuatro segmentos transmembranales de tipo α -hélice (TM1-TM4) por subunidad (Miyazawa et al., 2003). Aunque existe cierta evidencia de que los segmentos TM presentan estructura de tipo β -plegada, la obtención de la estructura de los dominios TM del RnACh, a partir del cristal obtenido de preparaciones de la raya eléctrica *Torpedo*, apoyó el modelo de cuatro α -hélices propuesto inicialmente.

A. Sitios de unión de glicina y estircnina al RGly

Inicialmente, la mutación de diferentes residuos localizados en la región NH₂-terminal de RGly α 1 recombinantes, permitió identificar la presencia de los residuos que son importantes para la unión de la glicina y/o del antagonista estircnina (Laube et al., 2002). Asimismo, el modelaje del RGly con base en la estructura del cristal de la proteína de unión de acetil colina (AChBP) (Brookhaven Protein Data Bank entry 1I9B) y de micrografías tridimensionales de alta resolución del RnACh (Brookhaven Protein Data Bank entry 1OED), ha provisto de información acerca de la arquitectura del sitio de unión de la glicina al RGly (Fig. 1). Un estudio reciente reveló que los sitios de unión de glicina y de estircnina se localizan en las interfases (+) y (-) entre las subunidades α y β del RGly, demostrando que diversos residuos altamente conservados en ambas subunidades están involucrados en la unión del ligando (Fig. 1). Específicamente, dos argininas homólogas localizadas en la interfase (-) de las subunidades α y β

establecen interacciones iónicas fuertes con el grupo α -carboxilo de la glicina, mientras que residuos ácidos localizados en la interfase (+) interaccionan con el grupo α -amino (Fig. 1). De forma similar, este tipo de interacciones median la unión de la glicina al receptor de glutamato de tipo N-metil D-aspartato (NMDA) (Laube et al., 1997); sin embargo, la estructura de las subunidades y de los sitios de unión de los receptores ionotrópicos de glutamato no está filogenéticamente relacionada con los RIAL TCL.

Como se puede observar en la figura 1, el número de sitios de unión de glicina y estricnina presentes en el RGly es diferente; los RGlys homoméricos poseen cinco sitios idénticos para la unión de glicina y de estricnina en la interfase de todas las subunidades α , mientras que las interfases de los RGlys heteroméricos no son las mismas: $\alpha\beta$, $\beta\alpha$ y $\beta\beta$. Aunque el sitio de unión de glicina comparte algunos residuos con el de estricnina no son sitios análogos, por lo que las propiedades de unión no son las mismas. En este sentido, en RGlys hetero-oligoméricos la estricnina interacciona preferencialmente con la interfase $\beta\alpha$, mientras que la farmacología de la interfase $\beta\beta$ del RGly no se conoce.

a. Agonistas del RGly

Tanto los RGlys nativos como los recombinantes son activados por diferentes aminoácidos que poseen diferente afinidad por el sitio de unión, con el siguiente orden de potencia: glicina > β -alanina > taurina > ácido γ -aminobutírico (GABA). En los RGlys $\alpha 1$ expresados en la línea celular HEK293 se observó que la glicina,

Tabla I. Miembros de la familia de **RIAL TCL**

Receptores TCL aniónicos

Receptores TCL catiónicos

Tabla I. Miembros de la familia de **RIAL TCL**

Receptores TCL aniónicos

Receptores TCL catiónicos

TIPO	SUBUNIDADES	ISOFORMAS
Receptor del ácido γ-aminobutírico (RGABA_A)	Alpha	$\alpha 1-\alpha 6$
	Beta	$\beta 1-\beta 3$
	Gamma	$\gamma 1-\gamma 3$
	Delta	δ
	Epsilon	ϵ
	Pi	π
	Theta	θ
	Rho	ρ
RGly	Alpha	$\alpha 1-\alpha 4$
	Beta	β

TIPO	SUBUNIDADES	ISOFORMAS
Receptor nicotínico de acetil colina RnACh	Alpha	$\alpha 1-\alpha 7, \alpha 9$
	Beta	$\beta 1-\beta 4$
	Gamma	γ
	Delta	δ
	Epsilon	ϵ
Serotonina (5HT)	5HT ₃	5HT ₃ A 5HT ₃ B 5HT ₃ C 5HT ₃ D
Canal iónico activado por zinc (ZAC)		ZAC

Receptores TCL aniónicos: Receptores permeables a cloruro.

Receptores TCL catiónicos: Receptores permeables a Na⁺, Ca²⁺ ó K⁺.

β -alanina y taurina funcionan como agonistas del receptor (Bormann et al., 1993; Lynch et al., 1997), mientras que la expresión de RGly $\alpha 1$ en ovocitos de *Xenopus* disminuye la afinidad de los agonistas en un orden de magnitud. Asimismo, la corriente máxima generada a concentraciones saturantes de β -alanina, taurina y GABA se redujo en comparación a aquella producida por glicina (Laube et al., 1995). Adicionalmente, en un estudio en el que se expresaron RGly $\alpha 1$ y $\alpha 2$ tanto en células HEK293 como en ovocitos de *Xenopus*, se reveló que la afinidad por la glicina, la taurina y el GABA varía (10 veces) entre célula y célula (De Saint Jan et al., 2001). Estos datos sugieren que la conformación del RGly en cada uno de los sistemas de expresión no es la misma, sin embargo, más estudios son necesarios para identificar el mecanismo que está participando. Con base en la información disponible hasta el momento, se sugiere que los RGly $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ exhiben la misma sensibilidad a los diferentes agonistas identificados para el RGly $\alpha 1$ (Kuhse et al., 1990; Gisselmann et al., 2002) y que la incorporación de la subunidad β tiene poco efecto sobre la sensibilidad del RGly a la glicina (Pribilla et al. 1992).

i. El alcaloide estricnina

El alcaloide estricnina es un potente y selectivo antagonista competitivo del RGly, exhibiendo una constante de disociación de 5-50 nM (Curtis et al. 1968; Young y Snyder, 1973, 1974; Schaeffer y Anderson, 1981; Pérez-León y Salceda, 1995; Velázquez Flores y Salceda, 2011). La sensibilidad que presenta el RGly a la estricnina, es una herramienta farmacológica que se utiliza para discriminar las

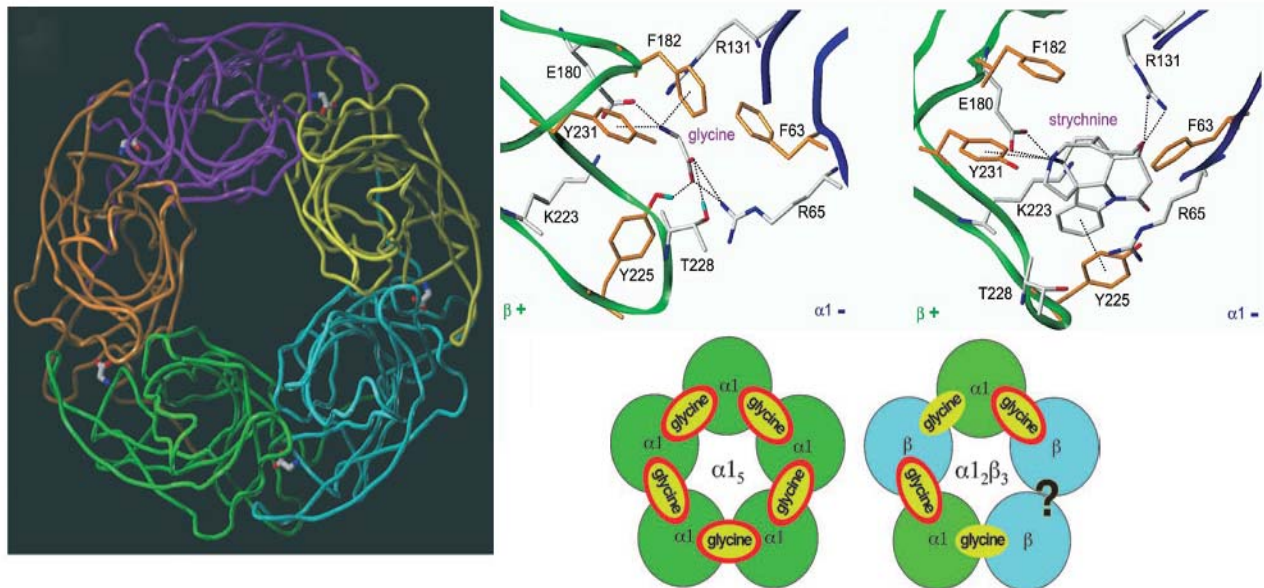


Fig. 1. MODELO EN EL QUE SE MUESTRA LA REGIÓN N-TERMINAL Y LOS SITIOS DE UNIÓN DE GLICINA Y ESTRICNINA EN Rglys HOMOMÉRICOS α_1 Y HETEROMÉRICOS $\alpha_1\beta$. Los receptores homoméricos presentan cinco sitios de unión a glicina (óvalos amarillos) y estricnina (óvalos con borde rojo), mientras que los heterómeros tienen cuatro sitios de unión de glicina, dos de los cuales también pueden unir estricnina (Modificado de Grudzinska et al., 2005; Betz y Laube, 2006).

corrientes mediadas por glicina de las producidas por GABA, así como para discernir del sitio de unión de glicina en el RGly de aquel presente en el receptor de tipo NMDA. Debido a su alta afinidad y especificidad, la ^3H -estricnina se ha utilizado ampliamente para establecer la acción de la glicina como neurotransmisor en diferentes áreas del SNC (Young y Snyder, 1973; 1974; Borbe et al., 1981) y para conocer la potencia y la acción alostérica de otros ligandos sobre el RGly (Maksay y Bíró, 2002).

Por medio de mutagénesis sitio dirigida, se observó que la variante $\alpha 2^*$, producida por empalme alternativo de la subunidad $\alpha 2$, posee una IC_{50} para estricnina de ~560 veces mayor que aquella que presentan las subunidades $\alpha 1$ ó $\alpha 2$ (Kuhse et al., 1990). La sensibilidad del RGly por la estricnina, se restableció al incorporar la mutación E167G en la subunidad $\alpha 2^*$, el cual es el único residuo que es diferente entre la subunidad $\alpha 2$ y la variante $\alpha 2^*$ (Kuhse et al., 1990). Asimismo, la mutación del residuo de glicina 160 de la subunidad $\alpha 1$ del RGly por un ácido glutámico, G160E, resultó en RGlys $\alpha 1^{\text{G160E}}$ insensibles a estricnina (Vanderberg et al., 1992). Por otra parte, la mutación Y161A también abolió la sensibilidad a la estricnina, aunque la mutación conservativa Y161F no tuvo efecto (Schmieden et al., 1993). Además, Vanderberg y sus colaboradores (1992a; 1992b; 1995) identificaron que los residuos K200 y Y202 establecen el sitio de unión de la estricnina al RGly.

B. Segmentos Transmembranales del RGly

La función principal de los segmentos TM es proveer de una barrera hermética para separar la vía por la que permean los iones en la región no polar de la bicapa lipídica. En la mayoría de los canales de los que se conoce su estructura, este fenómeno se establece por la cercanía con la que se disponen las α -hélices con respecto al plano de la membrana. Esta disposición también aplica para los miembros de la familia TCL, en donde los dominios TM2 de cada subunidad constituyen el poro. Los dominios TM1, TM3 y TM4 rodean al segmento TM2 y establecen la interfase con la membrana lipídica, aislando de esta manera al dominio TM2 de un medio ambiente hidrofóbico. Los dominios TM1-TM4 se encuentran dispuestos consecutivamente en el sentido de las manecillas del reloj, en donde los segmentos TM1 y TM3 se localizan más cerca del TM2 (Miyazawa et al., 2003).

a. Segmento TM1

El segmento TM1 se conecta directamente con el dominio NH₂-terminal y se piensa que funciona como el vínculo entre el sitio de unión del ligando y la puerta de activación del canal. A partir del cristal del RnACh, se observa que el dominio TM1 inicia en el residuo Y222 del RGly α 1 y entra a la membrana en el residuo M227. Es probable que el espacio extracelular que rodea al dominio TM1 se encuentre lleno de agua, debido a que la presencia de un reactivo acuoso específico para tirosinas marcó dos tirosinas en el segmento TM1 del RGly α 1.

Además, por medio del método de accesibilidad de cisteínas sustuidas (SCAM), se observó que diversos residuos extramembranales del dominio TM1 del RnACh se modifican en presencia de agentes hidrofílicos (Zhang y Karlin, 1997). Asimismo, diferentes líneas de evidencia sugieren que el segmento TM1 está involucrado en la apertura del canal de estos receptores (Akabas y Karlin, 1995; Engblom, 2002).

b. Segmento TM2

A partir de la utilización de diversas sustancias que bloquean el poro del RnACh, se sugirió que la estructura del dominio TM2 es de tipo α -hélice (Arias, 1998). Posteriormente, a partir de la estructura cristalina del RnACh de *Torpedo*, Miyazawa y sus colaboradores (2003) confirmaron que efectivamente el dominio TM2 forma una α -hélice. Para facilitar la comparación entre los diferentes miembros de la familia TCL, se utiliza una nomenclatura común que permite identificar a los residuos que forman el dominio TM2. Los aminoácidos del 10-19 del segmento TM2 del RGly se localizan en la región del poro del canal.

Diversos análisis estructurales, muestran que la disposición del segmento TM2 en la membrana, facilita el establecimiento de interacciones hidrofóbicas entre ciertos residuos de los dominios TM2 de las diferentes subunidades que conforman al receptor. El primer contacto ocurre entre la leucina 9 de una subunidad y el residuo 10 de la subunidad adyacente. El segundo contacto entre el dominio TM2 de las subunidades α 1 del RGly, se establece entre los residuos homólogos Q14' y T13', mientras que entre las subunidades β participan los residuos E14 y S13.

La arginina en la posición 19 define el borde externo de la porción embebida en la membrana del dominio TM2, aunque la estructura α -hélice se extiende hacia el espacio extracelular. El análisis del RGly y del receptor de GABA de tipo A (RGABA_A) por medio del método SCAM, confirmó que los residuos más externos del dominio TM2 se encuentran en contacto continuo con el agua.

c. Segmento TM3

Con base en la estructura del dominio TM3 de la subunidad α 1 del RGly propuesta por Miyazawa y sus colaboradores (2003), se sabe que este dominio comienza en el residuo I285 y que la porción que se encuentra embebida en la membrana empieza en el residuo A288 y termina en el residuo H311. Diferentes líneas de evidencia sugieren que al menos el 50% de la región NH₂-terminal del dominio TM3, forma una α -hélice anfipática. Por ejemplo, a través de diferentes pruebas lipofílicas se identificó una periodicidad de tipo α -hélice en los residuos orientados hacia la bicapa lipídica (Blanton y Cohen, 1994). Adicionalmente, el análisis del RGABA_A a través del método SCAM y de reactivos solubles en agua, reveló que efectivamente la mitad más externa del dominio TM3 posee estructura α -hélice (Williams y Akabas, 2001). De esta manera, con base en estudios estructurales y los realizados a través del método SCAM, se sugiere que esta porción del dominio TM3 forma una cavidad llena de agua diferente que el poro del canal, la cual cambia de conformación conforme el canal se abre, formando el sitio de unión de alcoholes y anestésicos volátiles. El estudio estructural de los dominios TM realizado por Miyazawa, reveló que el dominio TM3 establece contacto con los

dominios TM2 y TM4 en diferentes puntos. Sin embargo, el dominio TM3 parece contactar al dominio TM1 únicamente en la región interna de la membrana.

d. Segmento TM4

A partir de diversas pruebas hidrofóbicas realizadas en el RnACh (Blanton y Cohen, 1994) y de la mutación de diversos triptófanos del RGABA_A (Jenkins et al., 2002), se demostró que el dominio TM4, al igual que los dominios TM1-TM3, posee una estructura de tipo α -hélice. Adicionalmente, con base en la homología del RGly con el RnACh, se dedujo que el segmento TM4 del RGly α 1 inicia en el residuo K385 y termina en el V418. La región que se encuentra embebida en la membrana comprende del residuo K389 al I408, por lo que la α -hélice de este dominio se extiende 2.5 vueltas afuera de la membrana (Miyazawa et al., 2003).

C. Asa intracelular del RGly

Como se mencionó anteriormente, uno de los rasgos característicos de los receptores TCL es la presencia de un asa intracelular que conecta a los segmentos TM3-TM4 de estos canales. Debido a que este dominio intracelular está poco conservado entre los receptores de esta familia, es factible pensar que éste exhibe variaciones estructurales considerables. La única información de tipo estructural hasta la fecha, sugiere que el asa intracelular del RnACh de *Torpedo* forma una estructura similar a una “góndola flotante” que presenta huecos transversales (o portales) que conectan el poro con el citoplasma (Miyazawa et al. 1999). Debido a que estos portales son aproximadamente del mismo tamaño que

el ion que permea a través del poro del canal, se cree que este dominio influencia la permeabilidad del ion. En este sentido, la eliminación de tres residuos cargados positivamente en el asa intracelular del R5HT3_A, incrementa la conductancia unitaria de los cationes a través del poro (Kelley et al., 2003), lo que implica que estos residuos podrían estar rodeando los portales del canal. Adicional a esta evidencia, se sabe que la función de los receptores TCL se regula por la interacción de diferentes moléculas citoplásmicas con esta asa intracelular. En este sentido, los dominios intracelulares de las subunidades α y β del RGly poseen diversos sitios de ubiquitinación, interacción proteína-proteína y de fosforilación que determinan su localización celular, desensibilización y degradación (Ruiz-Gómez et al., 1991; Vaello et al., 1994; Büttner et al., 2001; Cascio et al. 2001).

II. Dominios de Regulación Intracelular del RGly

A. Dominio de Ubiquitinación

Las moléculas de ubiquitina pueden unirse covalentemente a las cadenas laterales de residuos de lisina específicos en la superficie citoplásmica de las proteínas. Para diferentes proteínas se conoce que la ubiquitinación y la “poli-ubiquitinación” inducen su internalización y degradación, incluyendo al RGly α 1 (Büttner et al, 2001). Después de su internalización, la ubiquitinación del RGly α 1 induce su proteólisis en un fragmento glucosilado de 35-kDa y otro de 17-kDa. El tamaño de los fragmentos reportados coincide con la localización del dominio de ubiquitinación en el asa intracelular. El dominio intracelular de unión de los

segmentos TM3-TM4 contiene en total 10 residuos de lisina, los cuales deben de ser ubiquitinizados antes de que el receptor se endocite; este mecanismo permite mantener un equilibrio de RGl_ys expresados en la membrana sináptica (Büttner et al., 2001).

B. Sitios SH3

Los dominios SH₃, son sitios de la proteína que permiten la interacción con proteínas del citoesqueleto. Debido a que la presencia de residuos de prolina induce la presencia de giros en las cadenas peptídicas, es común que estos residuos puedan formar estructuras helicoidales conocidas como hélices de poli-prolinas (P_{II}). A través de dicroísmo circular, se reveló que la subunidad α 1 del RGl_y contiene una fracción significativa (9%) de esta estructura, que podría formar parte de los dominios SH₃ (Cascio et al. 2001).

C. Fosforilación

a. Regulación por proteínas de tipo tirosina cinasa

La lavendustina A, inhibidor de tirosina cinasas (PTK), reduce las corrientes producidas por glicina en neuronas del hipocampo y de la médula espinal, mientras que la aplicación intracelular de una tirosina cinasa endógena, c-SRc, incrementó la magnitud de estas corrientes (Caraiscos et al., 2002). Este incremento se debió a un aumento en la afinidad del ligando por su receptor y estuvo acompañado de una mayor tasa de desensibilización (Caraiscos et al., 2002). En RGl_ys recombinantes $\alpha\beta$ expresados en la línea celular HEK 293, se

observó el mismo efecto producido por c-SRc, pero no en RGly homoméricos $\alpha 1$. La mutación de la tirosina 413 (Y413F) que se localiza en el asa intracelular que conecta a los segmentos TM3-TM4 de la subunidad β (Grenningloh et al., 1990), suprimió el efecto producido por diferentes moduladores de la fosforilación en tirosina (Caraiscos et al., 2002). Estos resultados, indican que la fosforilación del RGly por proteínas de tipo tirosina cinasa regula la función del receptor.

b. Proteínas cinasas A y C

Se anexa el artículo: “Modulación de los receptores ionotrópicos de tipo cys-loop por proteincinasas A y C” en donde se revisan y discuten los experimentos en los que se ha determinado el efecto que tiene la activación de la PKA y PKC sobre los miembros de la familia de RIAL TCL, incluyendo el RGly.

Modulación de los receptores ionotrópicos de tipo cys-loop por proteincinasas A y C

Miguel A. Velázquez-Flores, Rocío Salceda

Introducción. En el sistema nervioso, la neurotransmisión química rápida es mediada por receptores ionotrópicos que se activan por la unión de su ligando. La unión del ligando a su receptor, favorece la entrada selectiva de iones a la célula que cambia el potencial eléctrico de la membrana celular. Los receptores de tipo cys-loop pertenecen a la superfamilia de receptores ionotrópicos activados por ligando que comprende a los receptores nicotínicos de acetilcolina, del ácido gamma-aminobutírico, glicina, serotonina y zinc. En diversos estudios se demostró que la actividad de estos receptores se modifica en respuesta a la activación de las proteincinasas A y C; los diferentes resultados, aparentemente contradictorios, podrían explicarse por la participación de diversos factores como el tipo de subunidades que forman a los receptores, componentes del citoesqueleto y subtipos de cinasas y fosfatasa presentes en el tejido nervioso de estudio.

Objetivo. Presentar una revisión del efecto que las proteincinasas A y C ejercen sobre la actividad de los receptores ionotrópicos de tipo cys-loop.

Desarrollo. En esta revisión se describen los experimentos obtenidos en diversas regiones en las que se ha determinado el efecto que tiene la activación de estas cinasas sobre la función de los receptores de neurotransmisores mayormente distribuidos en el sistema nervioso central y que han sido objeto de estudio.

Conclusiones. La regulación de los receptores de tipo cys-loop por proteincinasas ocurre por medio de la activación de otros receptores (*cross-talk*) que se expresan en diversas etapas del desarrollo y áreas del sistema nervioso.

Palabras clave. Comunicación cruzada. Desensibilización. Fosforilación. Proteincinasas. Receptores cys-loop. Receptor ionotrópico.

Introducción

En el sistema nervioso, la neurotransmisión química es mediada tanto por receptores acoplados a proteínas G (RAPG) como por receptores ionotrópicos (RIAL). La unión del mensajero químico a un RAPG, instiga la activación de vías de señalización intracelulares que no sólo modifican la transmisión sináptica, sino que inducen o reprimen la transcripción de diversos genes involucrados en mecanismos como la sobrevivencia, proliferación y diferenciación [1-3] (Fig. 1a). Por su parte, la activación de los RIAL permite el flujo selectivo de iones al interior celular, lo cual modifica el potencial de equilibrio para cada uno de los iones y, de esta manera, el potencial de reposo de la neurona (Fig. 1b). El grado de despolarización de la membrana celular determina la generación de un potencial de acción y la transmisión de la información de una neurona a otra.

Los RIAL se agrupan en una superfamilia de canales iónicos que incluye a los receptores de glutamato de tipo N-metil D-aspartato (NMDA) y los no NMDA: kainato y AMPA; el de ATP (P2X), así como

los miembros de la subfamilia de receptores de tipo cys-loop (CL) que comprende al receptor nicotínico de acetilcolina (RnACh), del ácido γ -aminobutírico (GABA), glicina (RGly), serotonina (R5-HT₃) y zinc (ZAC). El rasgo que define a los receptores de tipo CL es la presencia de dos cisteínas altamente conservadas en el dominio NH₂-terminal que son importantes para la unión del ligando. Los miembros de esta familia están constituidos por cinco subunidades, que se disponen de manera asimétrica para formar el poro por donde fluyen los iones. Cada subunidad posee cuatro segmentos transmembranales (TM) de tipo α -hélice, un dominio NH₂ y un COO⁻ terminal localizados en la región extracelular, así como un dominio citoplásmico que posee diversos sitios de fosforilación [4-6] (Fig. 2). El asa citoplásmica es la menos conservada entre cada uno de los miembros de la familia, por lo que el número y la localización de los posibles sitios de fosforilación es muy variable. Debido a que se conoce en otros tipos de receptores que el grado de fosforilación determina su localización celular, desensibilización y degradación [7-10], resulta relevante el estudio de estos posibles sitios de fosforilación y su con-

División de Neurociencias.
Instituto de Fisiología Celular.
Universidad Nacional Autónoma
de México. México DF, México.

Correspondencia:

Dr. Miguel Ángel Velázquez
Flores. División de Neurociencias.
Instituto de Fisiología Celular.
Universidad Nacional Autónoma
de México. Apartado Postal 70-243.
México 04510, DF, México.

Fax:

(+5255) 5622-5747.

E-mail:

mvflores@email.ifc.unam.mx

Financiación:

El trabajo se realizó con el apoyo
de PAPIIT-UNAM IN207810.
M.A.V.F. tuvo el apoyo de
CONACYT, beca n.º I0006.

Aceptado tras revisión externa:

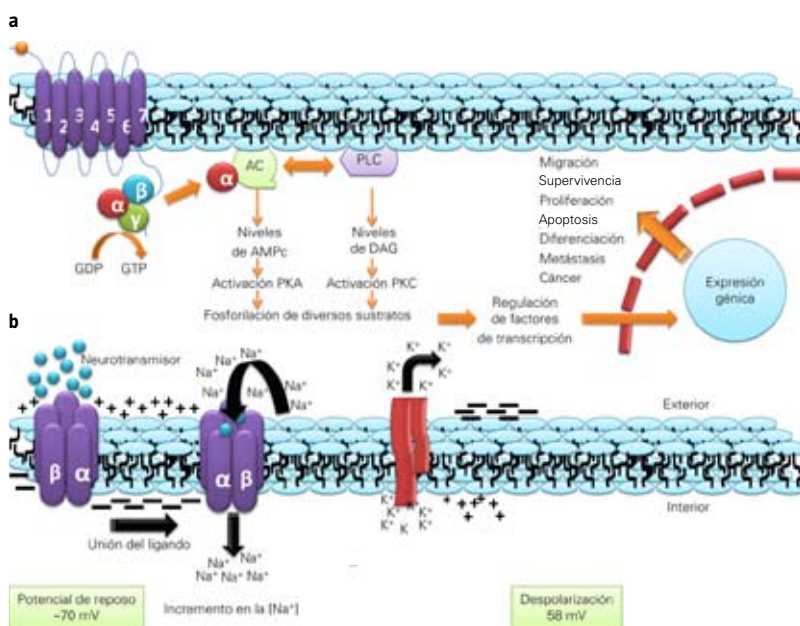
26.10.10.

Cómo citar este artículo:

Velázquez-Flores MA, Salceda R.
Modulación de los receptores
ionotrópicos de tipo cys-loop
por proteincinasas A y C.
Rev Neurol 2011; 52: 173-81.

© 2011 Revista de Neurología

Figura 1. En el sistema nervioso, la neurotransmisión química es mediada tanto por receptores metabotrópicos como por ionotrópicos. a) Los receptores metabotrópicos son proteínas transmembranales que están asociadas a proteínas G triméricas. La unión del neurotransmisor a este tipo de receptor, induce la disociación de las subunidades que componen a la proteína G y actúan sobre diversas proteínas efectoras como la adenilato ciclasa (AC) o la fosfolipasa C (PLC). La activación de estas proteínas incrementa la concentración intracelular de segundos mensajeros (AMPc o diacilglicerol) y esto induce la activación de la PKA o PKC. La activación de estas cinasas conlleva a la fosforilación de diversos sustratos, tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma. La fosforilación de proteínas específicas puede inducir la inhibición o activación de la actividad de factores de transcripción específicos; b) Los RIAL son canales que permiten la entrada selectiva de iones a la célula. Los receptores a neurotransmisores de tipo excitador permiten la entrada de cationes (Na^+ o Ca^{2+}) a la célula, mientras que aquellos para neurotransmisores inhibidores, como el ácido γ -aminobutírico y la glicina, permiten la entrada de Cl^- . La entrada de cationes induce la despolarización de la membrana celular y la de Cl^- su hiperpolarización.



secuencia en la actividad de los receptores de tipo CL, objetivo de este trabajo.

Receptor nicotínico de acetilcolina

La acetilcolina (ACh) es el transmisor excitador clásico de las uniones que se establecen entre el músculo esquelético y los axones de las neuronas motoras. Asimismo, la ACh es uno de los principales neurotransmisores excitadores del cerebro. La función de la ACh como neurotransmisor es mediada tanto por RAPG, que unen muscarina, como por receptores ionotrópicos selectivos al Na^+ , K^+ o Ca^{2+} que responden a nicotina (RnACh) [11-13].

El RnACh está constituido por la combinación de subunidades diferentes que le confieren propiedades farmacológicas y funcionales especiales [14,

15]. Estudios iniciales demostraron que los receptores nicotínicos que se expresan en la unión neuromuscular del órgano eléctrico de *Torpedo* en etapa embrionaria están conformados por las subunidades $\alpha_2\beta\gamma\delta$ [16], reemplazando la subunidad γ por la ϵ en el adulto (α_1) $_2\beta_1\delta\epsilon$; mientras que los RnACh localizados en los ganglios del sistema nervioso autónomo (SNA) poseen una estequiometría diferente (α_3) $_2(\beta_4)$ $_3$. En el cerebro, el RnACh puede estar constituido por la combinación de las subunidades α_2 - α_6 , α_{10} , β_2 - β_4 o únicamente por las subunidades (α_7) $_5$, (α_8) $_5$ y (α_9) $_5$ [17-19], siendo los receptores $\alpha_4\beta_2$ y (α_7) $_5$ los más abundantes [20,21]. Los receptores (α_1) $_2\beta_1\delta\epsilon$, (α_3) $_2(\beta_4)$ $_3$ y (α_4) $_2(\beta_2)$ $_3$ son selectivos a los iones Na^+ y K^+ [22,23], mientras que, los RnACh (α_4) $_3(\beta_2)$ $_2$ y los (α_7) $_5$ son permeables a Ca^{2+} [24]. Tanto los receptores de las uniones neuromusculares como los del SNA se localizan postsinápticamente, en tanto que los del cerebro se localizan también en las neuronas presinápticas.

Fosforilación del RnACh muscular

Inicialmente, se demostró que la fosforilación de las subunidades γ y δ del RnACh expresado en el órgano eléctrico de la raya eléctrica *Torpedo californica* es dependiente del incremento en los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la consecuente activación de la PKA [25]. La fosforilación del RnACh por la PKA induce un aumento en la tasa de desensibilización del receptor, es decir, se disminuye la actividad de éste en respuesta a la unión de ACh. De igual manera, la presencia de forskolina, activador de la adenilato ciclasa, y de diversos análogos del AMPc incrementan el estado de fosforilación y la tasa de desensibilización del receptor [26,27]. Por el contrario, en cultivos de miocitos obtenidos de *Xenopus* se demostró que la fosforilación del RnACh por PKA es mediada por la acción del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Fig. 3). La presencia del CGRP en el medio de cultivo incrementa el tiempo de apertura del receptor, efecto que se reprodujo al inducir la activación de la PKA por AMPc [28]. Estas diferencias sugieren que la regulación del RnACh por la PKA depende de la expresión específica de fosfatasa y de componentes del citoesqueleto.

Adicionalmente, diversos estudios demostraron que la forskolina puede actuar directamente sobre el RnACh [26,29,30] o debido a su naturaleza lipofílica, modificar la estructura lipídica de la membrana y de esta manera que cambiar las propiedades del receptor [31].

RnACh neuronal

Los RnACh formados por las subunidades α_4 y β_2 , son los receptores nicotínicos más abundantes en el cerebro [32,33]. Desde la década pasada, trabajos diversos muestran que la expresión y la función de los receptores $\alpha_4\beta_2$ es regulada por mecanismos de fosforilación y desfosforilación [34-39]. Estudios iniciales demostraron que los receptores constituidos por las subunidades $\alpha_4\beta_2$ aislados del cerebro [40] o expresados en ovocitos de *Xenopus* [41,42], se fosforilan *in vitro* por la actividad de la PKA y de la PKC. Posteriormente, se demostró que los residuos Ser 362 y la S467, así como la Ser 550 y posiblemente la S362 del dominio intracelular de la subunidad α_4 , se fosforilan en respuesta a la activación de la PKA y PKC, respectivamente.

Los RnACh $\alpha_4\beta_2$, al igual que otros subtipos de receptores nicotínicos, se localizan en la presinapsis, en donde modulan la liberación de dopamina, glutamato y del GABA [43,44]. Esto significa que la función de este receptor puede ser importante no sólo para la regulación de las vías colinérgicas, sino también para el funcionamiento de otras vías de neurotransmisión (Fig. 4). Adicionalmente, la fosforilación de la subunidad α_4 del receptor nicotínico por la PKA y PKC modifica la proporción de RnACh formados por las subunidades $(\alpha_4)_2(\beta_2)_3$ o $(\alpha_4)_3(\beta_2)_2$, de alta y baja afinidad por nicotina, respectivamente [38,39,45]. Asimismo, los cambios en la proporción de estos receptores en la superficie celular se traducen en una mayor o menor entrada de Na^+ o Ca^{2+} a la célula, lo que implica cambios en la información que se transmite al sistema.

Receptor del ácido γ -aminobutírico

El GABA funciona como neurotransmisor inhibidor en las interneuronas de la médula espinal y retina, así como en diferentes regiones del cerebro, particularmente en el cerebelo, los ganglios basales y la corteza cerebral. Al igual que la ACh, el GABA ejerce su efecto por medio de RAPG, receptor de GABA_B, y de RIAL (RGABA_A y RGABA_{A-p}), que son permeables a Cl^- . El RGABA_A puede estar constituido por la combinación de distintas subunidades (α [$\alpha 1$ - $\alpha 6$], β [$\beta 1$ - $\beta 4$], γ [$\gamma 1$ - $\gamma 3$], δ , ϵ , θ , π), aunque se tiene evidencia de que el subtipo de RGABA_A que predomina en el cerebro está compuesto por las subunidades α , β , $\gamma 2$. Por otra parte, el RGABA_{A-p}, anteriormente conocido como RGABA_C, es una subclase de los receptores GABA_A que está formado únicamente por la combinación de las subunidades

Figura 2. Estructura de los miembros de la subfamilia de receptores ionotrópicos de tipo CL. Cada una de las subunidades que componen a estos receptores posee un asa intracelular con diversos sitios de fosforilación. La fosforilación del receptor puede controlar su destino celular, así como el mecanismo involucrado en su desensibilización.

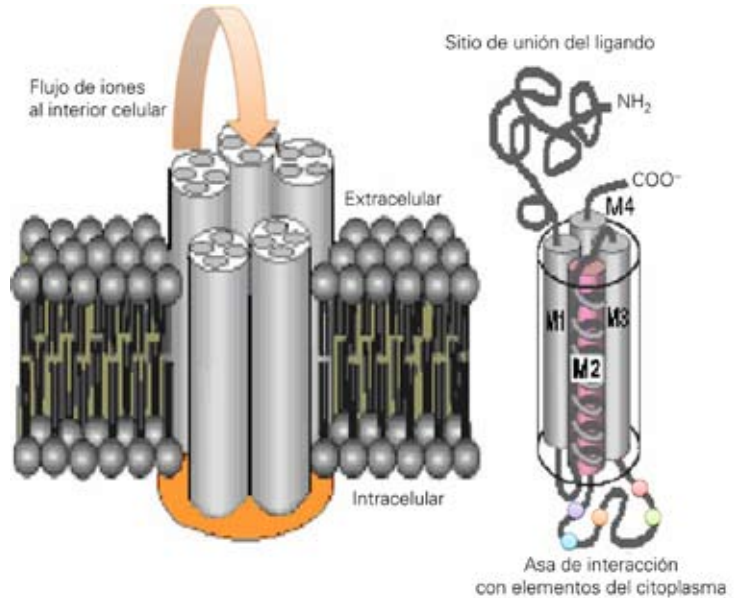


Figura 3. El péptido relacionado con el gen de la calcitonina es reconocido por un receptor acoplado a proteínas G. La unión del péptido a su receptor induce un cambio conformacional que permite la disociación de la subunidad α de la proteína G trimérica. Una vez disociada la subunidad α , ésta activa a la proteína de membrana adenilato ciclasa (AC), la cual en su estado activo hidroliza al adenosin trifosfato (ATP) y produce AMPc. El incremento en la concentración intracelular de AMPc, activa a la PKA y ésta fosforila y modifica la función del RnACh.

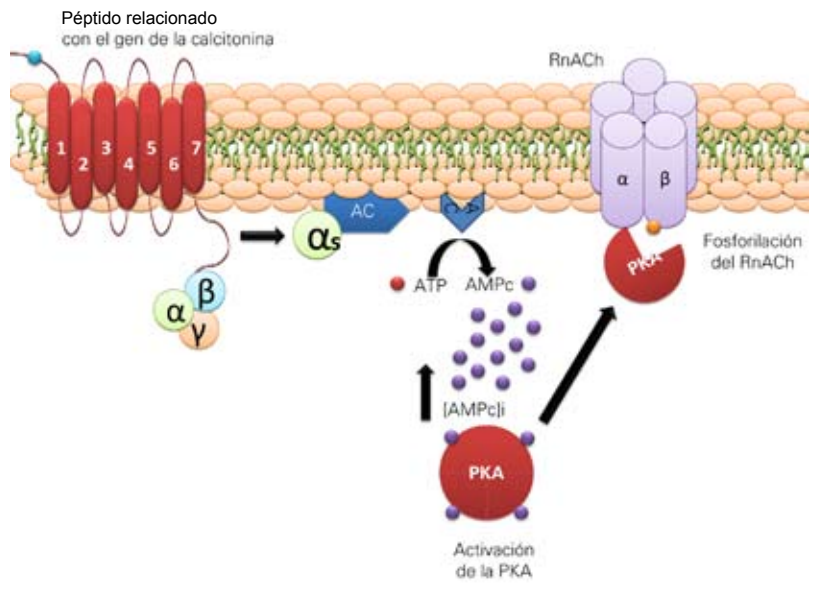
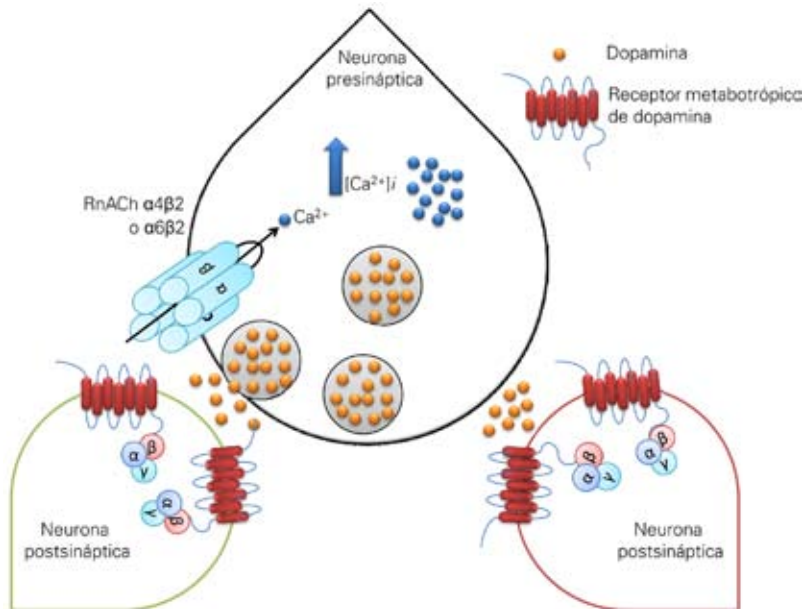


Figura 4. En el cuerpo estriado, la unión de ACh a tipos específicos de receptores nicotínicos que se localizan en la presinapsis modula la liberación del neurotransmisor dopamina. Una vez que la ACh se une a los receptores formados por las subunidades $\alpha 4$ o $\alpha 6$ y $\beta 2$, éstos permiten el flujo de iones Ca^{2+} al interior celular. El incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular induce la fusión de las vesículas presinápticas con la membrana celular y se libera la dopamina. La dopamina que se libera al espacio sináptico es reconocida en la postsinapsis por receptores acoplados a proteínas G, iniciándose una cascada de señalización que le permite responder al sistema.



rho (ρ). El receptor $\text{GABA}_{A-\rho}$, al igual que el RGABA_A , se expresa en diversas regiones del cerebro, pero en contraste al RGABA_A , éste se encuentra ampliamente expresado en la retina.

Regulación del RGABA_A

Desde hace tiempo se sabe que la noradrenalina potencia las respuestas producidas por GABA en células de Purkinje, debido a un incremento en los niveles intracelulares de AMPc que conlleva a la activación de la PKA [46]. Con base en trabajos diferentes, se conoce que las subunidades β son sustrato de la PKC, mientras que para la PKA sólo lo son la $\beta 1$ y $\beta 3$ [4,47-49]. La fosforilación de la subunidad $\beta 3$ por la PKA incrementa las corrientes producidas por GABA, mientras que la fosforilación de la subunidad $\beta 1$ lleva a una disminución de las mismas [4]. En este sentido, Brandon et al [50] demostraron que la proteína de anclaje de la cinasa A

(AKAP150) se une a las subunidades $\beta 1$ y $\beta 3$, pero no al resto de las subunidades de este receptor.

Por otra parte, la activación de la PKC abate las corrientes producidas por GABA en los RGABA_A $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ expresados en ovocitos de *Xenopus*, mientras que cuando se expresan en fibroblastos L929 las corrientes incrementan. Estos resultados sugieren que los subtipos de la PKC presentes en cada uno de estos sistemas de expresión no son las mismas. Asimismo, las proteínas de anclaje y andamiaje pueden variar.

Fisiológicamente, la función de los receptores ionotrópicos puede ser regulada de manera cruzada (*cross-talk*) por RAPG. Por ejemplo, en neuronas del bulbo olfatorio en cultivo, se demostró que la acción de la dopamina sobre el receptor D_1 , el cual activa a la PKA, incrementa la fosforilación del RGABA_A , reduciendo las corrientes inducidas por GABA. Por el contrario, la activación de la PKC, causada por la señalización del receptor de dopamina D_2 , incrementó estas corrientes en células mitrales [51]. Debido a que se sabe que la PKC controla el reciclaje de RGABA_A , es factible pensar que el incremento de las corrientes producidas por GABA ocurre debido a un aumento en la proporción de RGABA_A localizados en la superficie celular (Fig. 5).

Receptor de glicina

La glicina es el principal neurotransmisor inhibitorio de la médula espinal y se tiene evidencia de esta función en otras regiones del sistema nervioso central (SNC), incluida la retina. Su acción es mediada por un receptor postsináptico (RGly) que forma un canal selectivo a Cl^- que se antagoniza por el alcaloide estricnina. El RGly está formado por la combinación de dos subunidades α y tres β . Hasta el momento, se han identificado cuatro genes que codifican para distintas isoformas de la subunidad α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) y un solo gen que lo hace para la β . La combinación de las distintas isoformas de la subunidad α con la β tiene como resultado la expresión de receptores con propiedades específicas [52-56].

Aunque se conoce que tanto la activación de la PKA como de la PKC modifica las corrientes producidas por glicina en diferentes áreas del cerebro, los mecanismos por medio de los cuales ocurre esta regulación no se conocen. Si bien la fosforilación de la subunidad α del RGly por la PKA se demostró en ensayos *in vitro* [57], la mayoría de las isoformas de la subunidad α no muestran secuencias consenso de fosforilación por la PKA. La excepción es la variante producida por empalme alternativo de la sub-

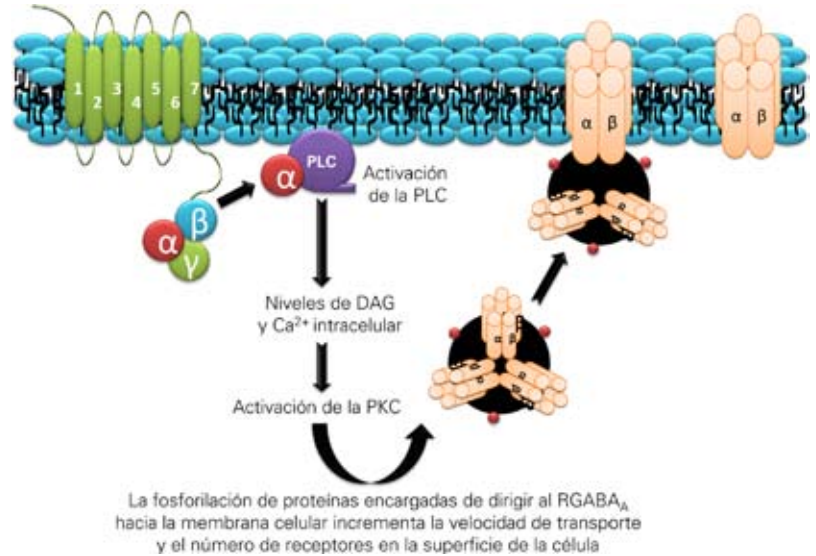
unidad $\alpha 1$, la $\alpha 1^{INS}$, que posee una inserción de ocho aminoácidos (... SPMLNLFQ ...) que incluye una serina que se pudiera fosforilar por dicha cinasa [58]. Asimismo, en un estudio realizado en la línea celular HEK293 se demostró que la activación de la PKA, en respuesta a la prostaglandina 2, induce la fosforilación directa del RGly $\alpha 3$ [6]. En la médula espinal del organismo adulto, coexisten RGlys formados por las subunidades $\alpha 1\beta$ y $\alpha 3\beta$, así como por la variante $\alpha 1^{INS}$; además, se ha demostrado que una proporción de receptores formados por la subunidad $\alpha 3$ se localizan en áreas específicas de la médula espinal donde no se expresan aquellos constituidos por la subunidad $\alpha 1$ [6]. Adicionalmente, se sabe que la subunidad β del RGly contiene un sitio consenso en el cual pudiera actuar la PKA [59]; sin embargo, el impacto fisiológico no se ha determinado.

La activación de la PKA incrementa las corrientes producidas por glicina en la médula espinal, así como en ovocitos de *Xenopus* en los que se expresaron RGlys $\alpha 1$ [57,60], mientras que en neuronas de la sustancia negra la activación de esta cinasa disminuye las corrientes inducidas por glicina [61]. Además, Agopyan et al comunicaron que la activación de la PKA disminuye la probabilidad de apertura del receptor en neuronas aisladas del hipotálamo ventromedial en tanto que incrementa la probabilidad de apertura del canal en neuronas del trigémino [60,62].

Por otra parte, la subunidad $\alpha 1$ del RGly se fosforila en la serina 391 en respuesta a la activación de la PKC [63], misma posición en la que se fosforila la subunidad β del receptor $GABA_A$ por la PKA y PKC. Igualmente, la subunidad β del RGly posee un sitio consenso de fosforilación por PKC en la posición 389 del dominio M3-M4 [58]. En diversas áreas del cerebro, la activación de la PKC modula de manera distinta las corrientes producidas por glicina. En neuronas del hipocampo [64], en neuronas comisurales de la región sacra dorsal [65], así como en neuronas aisladas de la sustancia negra [66], la activación de la PKC incrementa la corriente producida por glicina; mientras que ésta disminuye en neuronas de la médula espinal [67,68] y en RGly expresados en ovocitos de *Xenopus* [57,69].

En células ganglionares aisladas de la retina de la salamandra, se observó que la activación tanto de la PKA como de la PKC modifica las corrientes mediadas por el RGly. Asimismo, en la retina intacta de la rana, la activación de estas cinasas redujo la unión específica de [3 H]glicina y [3 H]estricnina al RGly [70]. Debido a que el ensayo de unión de ligandos radiactivos nos permite identificar a los re-

Figura 5. Regulación del número de $RGABA_A$ localizados en la superficie celular. La fosforilación de proteínas involucradas en el tráfico subcelular del receptor regula el número de $RGABA_A$ localizados en la superficie celular. La proporción de $RGABA_A$ localizados en la superficie celular es importante para controlar el grado de despolarización de la neurona.



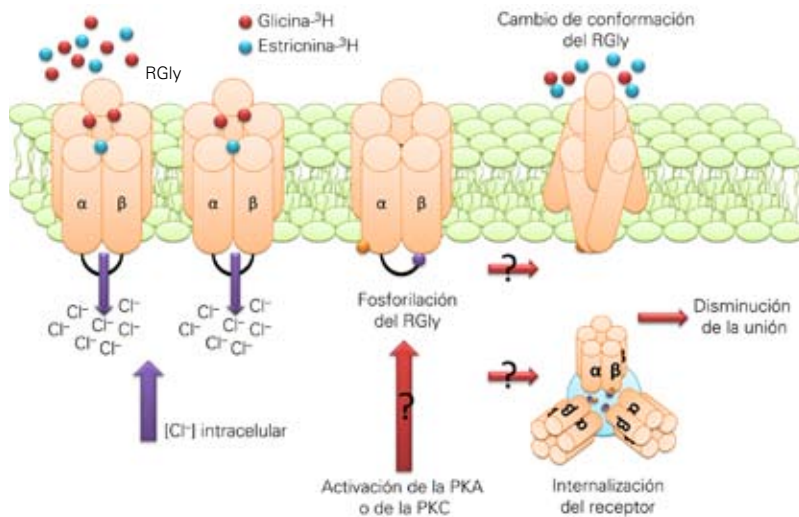
ceptores localizados en la superficie celular, la disminución de la unión de los radioligandos al receptor indica que la función del RGly es modulada por la acción de estas cinasas (Fig. 6).

Receptor de serotonina 5-HT₃

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) regula una amplia gama de procesos biológicos por medio de la unión a diversos RAPG (5-HT_{1A}-5-HT_{1D}, 5-HT₂, 5-HT₄), así como a receptores ionotrópicos de tipo CL (R5-HT₃). Los R5-HT₃ son canales constituidos por la combinación de diversas subunidades (5-HT_{3A}-5-HT_{3E}) que inducen una despolarización de la membrana celular debido a una facilitación en la entrada de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ hacia el interior celular. La expresión *in vitro* de las subunidades 5-HT_{3A} forma R5-HT₃ funcionalmente activos [71], mientras que la de las demás subunidades necesita la coexpresión de la subunidad 5-HT_{3A} para formar receptores funcionales [72].

La mayor importancia de los R5-HT₃ radica en su potencial terapéutico en el tratamiento de la náusea y emesis causadas por la radioterapia y qui-

Figura 6. El RGly en la retina de la rana se modula por la PKA y PKC. La unión de ligandos radiactivos nos permite conocer la proporción de receptores que están localizados en la membrana celular. La activación de la PKA con forskolina o de la PKC con el éster de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) disminuyó la unión de glicina- ^3H y estriquina- ^3H al RGly, lo que sugiere que el número de receptores en la superficie celular disminuye. Asimismo, estos resultados sugieren que el RGly puede fosforilarse e inducir un cambio conformacional o su internalización, lo que disminuiría la unión de los ligandos al receptor.



mioterapia en pacientes con cáncer [73], por lo que el estudio de estos receptores se ha centralizado en la creación de fármacos que controlen estos síntomas [74,75] y muy poco se conoce respecto a la regulación del R5-HT₃. Existe evidencia de que ciertos anestésicos volátiles, n-alcoholes y la PKC tienen un efecto sobre la función de este receptor. Las corrientes inducidas por 5-HT y mediadas por receptores homoméricos R5-HT_{3A} se potencian en presencia de halotano e isoflurano y se inhiben por el sevoflurano [76]; de forma similar, el sevoflurano inhibe las corrientes mediadas por receptores heteroméricos R5-HT_{3AB} [77]. Por su parte, los n-alcoholes con un volumen molecular menor que 110 Å³ incrementan las corrientes mediadas por R5-HT_{3AB}, mientras que aquellos que tienen un volumen mayor las inhiben [77]. Asimismo, la función de R5-HT_{3A} incrementa en presencia de etanol y tricloroetanol, mientras que la de R5-HT_{3AB} es menos o totalmente insensible a la regulación por estos alcoholes [78]. Finalmente, en neuronas aisladas del ganglio de la raíz dorsal, Hu y Li determinaron que la inhibición de la PKC disminuye las corrientes mediadas por R5-HT₃ sin que a la fecha se conozca su significado fisiológico [79].

Receptor de zinc

En el SNC, el zinc está involucrado en procesos como la neurogénesis, migración celular y sinaptogénesis [80-84], y en la regulación de receptores de purinas, glutamato, 5-HT, GABA y glicina [85-88]. La identificación reciente de un receptor que se activa por zinc indica que este ion podría funcionar como neurotransmisor excitador en ciertas regiones del SNC [89,90]. El receptor ZAC, expresado *in vitro*, es activado por zinc e inhibido por tubocurarina [89]. Una variedad de estudios son necesarios para comprender el efecto fisiológico del receptor ZAC y su posible regulación por proteincinasas.

Comentarios finales

Los receptores de la superfamilia de RIAL son los encargados de mediar la neurotransmisión rápida en el SNC y periférico. Debido a la importancia que tiene la activación e inactivación de una vía determinada de neurotransmisión, existen diversos mecanismos que controlan el funcionamiento de estos receptores. Al igual que los RAPG, los receptores ionotrópicos se desensibilizan en presencia del ligando y pueden ser internalizados para atenuar la señal [90,91]. Asimismo, se conoce que la fosforilación de los RIAL por proteincinasas –regulación cruzada (*cross-talk*)– puede aumentar o disminuir su función [6,93,94].

Las distintas respuestas de los receptores CL a la activación de la PKA y PKC en diversas áreas del cerebro, aunque aparentemente contradictorias, parecen relacionarse con diferencias tanto temporales como espaciales de la expresión de las diversas isoformas y variantes de las subunidades que los componen. También se sugiere que las proteínas que anclan el citoesqueleto a los receptores CL influyen en la proximidad de las cinasas y fosfatasas al dominio intracelular de éstos, por lo que parece que su fosforilación no depende únicamente de las subunidades que los forman, sino también de la accesibilidad que tengan las cinasas y fosfatasas a esta región. La presencia de diversos tipos y subtipos de proteínas cinasas y fosfatasas, que responden a diferentes estímulos y que no necesariamente actúan sobre los mismos sustratos, complica aún más la interpretación de los resultados.

En conclusión, el estudio de la regulación de los receptores CL por proteincinasas necesita contemplar diversos factores que van más allá del efecto que produce la interacción cinasa-receptor. Es necesario conocer qué subtipo o subtipos de canales

se expresan en la región de estudio; sin embargo, actualmente no se cuenta con herramientas farmacológicas suficientes para hacerlo, por lo que es importante abundar en la síntesis de agonistas y antagonistas de los receptores de esta familia, así como de activadores e inhibidores específicos de las distintas isoformas de la PKA y PKC, que nos permitan conocer el efecto sobre los distintos tipos de receptores. También es importante establecer la función que el citoesqueleto y otras proteínas de anclaje ejercen sobre estos receptores ionotrópicos.

Bibliografía

1. St Hilaire RC, Murthy SN, Kadowitz PJ, Jeter JR Jr. Role of VPAC1 and VPAC2 in VIP mediated inhibition of rat pulmonary artery and aortic smooth muscle cell proliferation. *Peptides* 2010; 2: 6.
2. Borroni EM, Bonocchi R, Mantovani A, Locati M. Chemoattractant receptors and leukocyte recruitment: more than cell migration. *Sci Signal* 2009; 2: 1-3.
3. Choi LJ, Jenikova G, Hanson E, Spehlmann ME, Boehling NS, Kirstein SL, et al. Coordinate down-regulation of adenylyl cyclase isoforms and the stimulatory G protein (G(s)) in intestinal epithelial cell differentiation. *J Biol Chem* 2010; 285: 12504-11.
4. McDonald BJ, Amato A, Connolly CN, Benke D, Moss SJ, Smart TG. Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat Neurosci* 1998; 1: 23-8.
5. Guo X, Wecker L. Identification of three cAMP-dependent protein kinase (PKA) phosphorylation sites within the major intracellular domain of neuronal nicotinic receptor alpha4 subunits. *J Neurochem* 2002; 82: 439-47.
6. Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, et al. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 2004; 304: 884-7.
7. Hanyaloglu AC, Von Zastrow M. Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48: 537-68.
8. Kelly E, Bailey CP, Henderson G. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* 2008; 153: S379-88.
9. Cho D, Zheng M, Min C, Ma L, Kurose H, Park JH, Kim KM. Agonist-induced endocytosis and receptor phosphorylation mediate resensitization of dopamine D(2) receptors. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 574-86.
10. Pangburn HA, Ahnen DJ, Rice PL. Sulindac metabolites induce proteosomal and lysosomal degradation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Prev Res* 2010; 3: 560-72.
11. Veyra-Reyes P, Venebra-Muñoz A, Rivas-Santiago B, García-García F. Acción de la nicotina como antidepresivo y regulador del sueño en sujetos deprimidos. *Rev Neurol* 2009; 49: 661-7.
12. Changeux JP, Bertrand D, Corringer PJ, Dehaene S, Edelstein S, Lena C, et al. Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Brain Res Rev* 1998; 26: 198-216.
13. Celie HN, Rossum-Fikkert SE, Van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB, Sixma TK. Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 2004; 41: 907-14.
14. Matsubayashi H, Inoue A, Amano T, Seki T, Nakata Y, Sasa M, et al. Involvement of alpha7- and alpha4beta2-type postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors in nicotine-induced excitation of dopaminergic neurons in the substantia nigra: a patch clamp and single-cell PCR study using acutely dissociated nigral neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 129: 1-7.
15. Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux J P. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 733-50.
16. Reynolds J, Karlin K. Molecular weight in detergent solution of acetylcholine receptor from Torpedo californica. *Biochem* 1978; 17: 2035-8.
17. Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S. alpha9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 1994; 79: 705-15.
18. Gerzanich V, Anand R, Lindstrom J. Homomers of alpha8 and alpha7 subunits of nicotinic receptors exhibit similar channel but contrasting binding sites properties. *Mol Pharmacol* 1994; 45: 212-20.
19. Changeux JP. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 389-401.
20. Chen D, Patrick JW. The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *J Biol Chem* 1997; 272: 24024-9.
21. Zoli M, Léna C, Picciotto MR, Changeux JP. Identification of four classes of brain nicotinic receptors using beta2 mutant mice. *J Neurosci* 1998; 18: 4461-72.
22. Takeuchi A, Takeuchi N. On the permeability of end-plate membrane during the action of transmitter. *J Physiol (Lond)* 1960; 154: 52-67.
23. Linder TM, Quastel DM. A voltage-clamp study of the permeability change induced by quanta of transmitter at the mouse endplate. *J Physiol* 1978; 281: 535-56.
24. Gotti C, Fornasari D, Clementi F. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol* 1997; 53: 199-237.
25. Haganir RL, Greengard P. cAMP-dependent protein kinase phosphorylates the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 1130-4.
26. Middleton P, Jaramillo F, Schuetze SM. Forskolin increases the rate of acetylcholine receptor desensitization at rat soleus endplates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 4967-71.
27. Miles K, Anthony DT, Rubin LL, Greengard P, Haganir RL. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor phosphorylation in rat myotubes by forskolin and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 6591-5.
28. Lu B, Fu WM, Greengard P, Poo MM. Calcitonin gene-related peptide potentiates synaptic responses at developing neuromuscular junction. *Nature* 1993; 363: 76-9.
29. Deana A, Scuka M. The effect of forskolin on the response of acetylcholine receptors in frog sartorius endplate. *Neurosci Lett* 1990; 114: 272-6.
30. Lorenzon P, Mozrzymas JW, Eusebi F, Ruzzier F. Forskolin reduces the activity of the rat muscle embryonic type acetylcholine receptor channel. *Brain Res* 1995; 703: 100-4.
31. McHugh EM, McGee R Jr. Direct anesthetic-like effects of forskolin on the nicotinic acetylcholine receptors of PC12 cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 3103-6.
32. Whiting P, Lindstrom J. Pharmacological properties of immune-isolated neuronal nicotinic receptors. *J Neurosci* 1986; 6: 3061-9.
33. Zoli M, Le Novère N, Hill JA Jr, Changeux JP. Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 1995; 15: 1912-39.
34. Rothhut B, Romano SJ, Vijayaraghavan S, Berg DK. Post-translational regulation of neuronal acetylcholine receptors stably expressed in a mouse fibroblast cell line. *J Neurobiol* 1996; 29: 115-25.
35. Eilers H, Schaeffer E, Bickler PE, Forsayeth JR. Functional deactivation of the major neuronal nicotinic receptor caused by nicotine and a protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 1997; 52: 1105-12.
36. Gopalakrishnan M, Molinari EJ, Sullivan JP. Regulation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. *Mol Pharmacol* 1997; 52: 524-34.

37. Fenster CP, Beckman ML, Parker JC, Sheffield EB, Whitworth TL, Quick MW, et al. Regulation of alpha4beta2 nicotinic receptor desensitization by calcium and protein kinase C. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 432-43.
38. Jeanclos EM, Lin L, Treuil MW, Rao J, DeCoster MA, Anand R. The chaperone protein 14-3-3beta interacts with the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit. Evidence for a dynamic role in subunit stabilization. *J Biol Chem* 2001; 276: 28281-90.
39. Nashmi R, Dickinson ME, McKinney S, Jareb M, Labarca C, Fraser SE, et al. Assembly of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors assessed with functional fluorescently labeled subunits: effects of localization, trafficking, and nicotine-induced upregulation in clonal mammalian cells and in cultured midbrain neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 11554-67.
40. Nakayama H, Okuda H, Nakashima T. In vitro phosphorylation of rat brain nicotinic acetylcholine receptor by cAMP-dependent protein kinase. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 707: 439-42.
41. Hsu YN, Edwards SC, Wecker L. Nicotine enhances the cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of alpha4 subunits of neuronal nicotinic receptors. *J Neurochem* 1997; 69: 2427-31.
42. Wecker L, Guo X, Ryczer AM, Edwards SC. Cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) and protein kinase C phosphorylate sites in the amino acid sequence corresponding to the M3/M4 cytoplasmic domain of alpha4 neuronal nicotinic receptor subunits. *J Neurochem* 2001; 76: 711-20.
43. Wonnacott S, Barik J, Dickinson J, Jones IW. Nicotinic receptors modulate transmitter cross talk in the CNS: nicotinic modulation of transmitters. *J Mol Neurosci* 2006; 30: 137-40.
44. Dani JA. Nicotinic receptor activity alters synaptic plasticity. *Sci World J* 2001; 1: 393-5.
45. Exley R, Moroni M, Sasdelli F, Houlihan LM, Lukas RJ, Sher E, et al. Chaperone protein 14-3-3 and protein kinase A increase the relative abundance of low agonist sensitivity human alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* 2006; 98: 876-85.
46. Yeh HH, Woodward DJ. Beta-1 adrenergic receptors mediate noradrenergic facilitation of Purkinje cell responses to gamma-aminobutyric acid in cerebellum of rat. *Neuropharmacology* 1983; 22: 629-39.
47. Krishek BJ, Xie X, Blackstone C, Hagan RL, Moss SJ, Smart TG. Regulation of GABAA receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* 1994; 12: 1081-95.
48. Moss SJ, Smart TG. Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation. *Int Rev Neurobiol* 1996; 39: 1-52.
49. Smart TG. Regulation of excitatory and inhibitory neurotransmitter-gated ion channels by protein phosphorylation. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 358-67.
50. Brandon NJ, Jovanovic JN, Colledge M, Kittler JT, Brandon JM, Scott JD, et al. A-kinase anchoring protein 79/150 facilitates the phosphorylation of GABA(A) receptors by cAMP-dependent protein kinase via selective interaction with receptor beta subunits. *Mol Cell Neurosci* 2003; 22: 87-97.
51. Brünig I, Sommer M, Hatt H, Bormann J. Dopamine receptor subtypes modulate olfactory bulb gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2456-60.
52. Kuhse J, Schmieden V, Betz H. Identification and functional expression of a novel ligand binding subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 1990; 265: 22317-20.
53. Akagi H. Expression and function of glycine-gated Cl⁻ channels. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1992; 99: 287-95.
54. Mangin JM, Baloul M, Prado de Carvalho L, Rogister B, Rigo JM, Legendre P. Kinetic properties of the alpha2 homo-oligomeric glycine receptor impairs a proper synaptic functioning. *J Physiol* 2003; 553: 369-86.
55. Mohammadi B, Krampfl K, Cetinkaya C, Moschref H, Grosskreutz J, Dengler R, et al. Kinetic analysis of recombinant mammalian alpha(1) and alpha(1)beta glycine receptor channels. *Eur Biophys J* 2003; 32: 529-36.
56. Miller PS, Harvey RJ, Smart TG. Differential agonist sensitivity of glycine receptor alpha2 subunit splice variants. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 19-26.
57. Vaello ML, Ruiz-Gómez A, Lerma J, Mayor F Jr. Modulation of inhibitory glycine receptors by phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 2002-8.
58. Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, et al. Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 1991; 266: 2048-53.
59. Grenningloh G, Pribilla I, Prior P, Multhaup G, Beyreuther K, Taleb O, et al. Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron* 1990; 4: 963-70.
60. Song YM, Huang LY. Modulation of glycine receptor chloride channels by cAMP-dependent protein kinase in spinal trigeminal neurons. *Nature* 1990; 348: 242-5.
61. Inomata H, Nabekura J, Akaike N. Suppression of taurine response in acutely dissociated substantia nigra neurons by intracellular cyclic AMP. *Brain Res* 1993; 615: 347-50.
62. Agopyan N, Tokutomi N, Akaike N. Protein kinase A-mediated phosphorylation reduces only the fast desensitizing glycine current in acutely dissociated ventromedial hypothalamic neurons. *Neurosci* 1993; 56: 605-15.
63. Ruiz-Gómez A, Vaello ML, Valdivieso F, Mayor F Jr. Phosphorylation of the 48-kDa subunit of the glycine receptor by protein kinase C. *J Biol Chem* 1991; 266: 559-66.
64. Schönrock B, Bormann J. Modulation of hippocampal glycine receptor channels by protein kinase C. *Neuroreport* 1995; 6: 301-4.
65. Xu TL, Nabekura J, Akaike N. Protein kinase C-mediated enhancement of glycine response in rat sacral dorsal commissural neurones by serotonin. *J Physiol* 1996; 496: 491-501.
66. Nabekura J, Omura T, Horimoto N, Ogawa T, Akaike N. Alpha 1 adrenoceptor activation potentiates taurine response mediated by protein kinase C in substantia nigra neurons. *J Neurophysiol* 1996; 76: 2455-60.
67. Tapia JC, Espinoza F, Aguayo LG. Differential intracellular regulation of cortical GABA(A) and spinal glycine receptors in cultured neurons. *Brain Res* 1997; 769: 203-10.
68. Albarran FA, Roa JP, Navarrete R, Castillo R, Nualart F, Aguayo LG. Effect of protein kinase C activation on the glycine evoked Cl⁻ current in spinal cord neurons. *Brain Res* 2001; 902: 1-10.
69. Uchiyama M, Hirai K, Hishinuma F, Akagi H. Down-regulation of glycine receptor channels by protein kinase C in *Xenopus* oocytes injected with synthetic RNA. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 24: 295-300.
70. Salceda R, Aguirre-Ramírez M. Characterization of strychnine-sensitive glycine receptor in the intact frog retina: modulation by protein kinases. *Neurochem Res* 2005; 30: 411-6.
71. Belelli D, Balcarek JM, Hope AG, Peters JA, Lambert JJ, Blackburn TP. Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3AS receptor subunit. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 1054-62.
72. Niesler B, Walstab J, Combrink S, Möller D, Kapeller J, Rietdorf J, et al. Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT3C, 5-HT3D, and 5-HT3E. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 8-17.
73. Gregory RE, Ettinger DS. 5-HT3 receptor antagonists for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. A comparison of their pharmacology and clinical efficacy. *Drugs* 1998; 55: 173-89.
74. Olver IN. Update on anti-emetics for chemotherapy-induced emesis. *Intern Med J* 2005; 35: 478-81.
75. Rojas C, Li Y, Zhang J, Stathis M, Alt J, Thomas AG, et al. The antiemetic 5-HT3 receptor antagonist palonosetron inhibits Substance P-mediated responses in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 335: 362-8.
76. Suzuki T, Koyama H, Sugimoto M, Uchida I, Mashimo T. The diverse actions of volatile and gaseous anesthetics on human-cloned 5-hydroxytryptamine3 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesthesiology* 2002; 96: 699-704.
77. Stevens R, Rusch D, Solt K, Raines DE, Davies PA. Modulation of human 5-hydroxytryptamine type 3AB

- receptors by volatile anesthetics and n-alcohols. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 338-45.
78. Hayrapetyan V, Jenschke M, Dillon GH, Machu TK. Co-expression of the 5-HT(3B) subunit with the 5-HT(3A) receptor reduces alcohol sensitivity. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 142: 146-50.
 79. Hu HZ, Li ZW. Modulation of nicotinic ACh-, GABAA- and 5-HT3-receptor functions by external H-7, a protein kinase inhibitor, in rat sensory neurones. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1195-201.
 80. Dvergsten CL, Fosmire GJ, Ollerich DA, Sandstead HH. Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. I. Impaired acquisition of granule cells. *Brain Res* 1983; 271: 217-26.
 81. Dvergsten CL, Fosmire GJ, Ollerich DA, Sandstead HH. Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. II. Impaired maturation of Purkinje cells. *Brain Res* 1984; 318: 11-20.
 82. Dvergsten CL, Johnson LA, Sandstead HH. Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. III. Impaired dendritic differentiation of basket and stellate cells. *Brain Res* 1984; 318: 21-6.
 83. Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr* 2000; 130: S1471-83.
 84. Sandstead HH, Frederickson CJ, Penland JG. History of zinc as related to brain function. *J Nutr* 2000; 130: S496-502.
 85. Hubbard PC, Lummis SC. Zn(2+) enhancement of the recombinant 5-HT(3) receptor is modulated by divalent cations. *Eur J Pharmacol* 2000; 394: 89-197.
 86. Vorobjev VS, Sharonova IN, Sergeeva OA, Haas HL. Modulation of ATP-induced currents by zinc in acutely isolated hypothalamic neurons of the rat. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 919-26.
 87. Smart TG, Hosie AM, Miller PS. Zn²⁺ ions: Modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist* 2004; 10: 432-42.
 88. Miller PS, Da Silva HM, Smart TG. Molecular basis for zinc potentiation at strychnine-sensitive glycine receptors. *J Biol Chem* 2005; 280: 37877-84.
 89. Davies PA, Wang W, Hales TG, Kirkness EF. A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn²⁺. *J Biol Chem* 2003; 278: 712-17.
 90. Houtani T, Munemoto Y, Kase M, Sakuma S, Tsutsumi T, Sugimoto T. Cloning and expression of ligand-gated ion-channel receptor L2 in central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 277-85.
 91. Armstrong N, Jasti J, Beich-Frandsen M, Gouaux E. Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor. *Cell* 2006; 127: 85-97.
 92. Rivera R, Rozas JL, Lerma J. PKC-dependent autoregulation of membrane kainate receptors. *EMBO J* 2007; 26: 4359-67.
 93. Pollock VV, Pastoor T, Katnik C, Cuevas J, Wecker L. Cyclic AMP-dependent protein kinase A and protein kinase C phosphorylate alpha4beta2 nicotinic receptor subunits at distinct stages of receptor formation and maturation. *Neuroscience* 2009; 158: 1311-25.
 94. Tang X, Hernández CC, Macdonald RL. Modulation of spontaneous and GABA-evoked tonic alpha4beta3delta and alpha4beta3gamma2L GABAA receptor currents by protein kinase A. *J Neurophysiol* 2010; 103: 1007-19.

Cys-loop ligand-gated ion channels modulation by protein kinases A and C

Introduction. In the nervous system, rapid chemical neurotransmission is mediated by ionotropic receptors that are activated by ligand binding. Ligand binding to its receptor promotes the selective flow of ions into the cell which changes the electrical potential of the cell membrane. Cys-loop type receptors belong to the ligand-gated ion channel superfamily including the nicotinic acetylcholine receptor, the gamma-aminobutyric acid, glycine, serotonin and zinc. Several studies showed that the activity of these receptors was modified in response to protein kinases A and C activation; the different results, apparently contradictory, could be explained by the involvement of several factors such as the type of subunits that make up these receptors, components of the cytoskeleton and sub-types of kinases and phosphatases present in nerve tissue studied.

Aim. To review the effect of protein kinases A and C on the activity of cys-loop receptors.

Development. In this review we describe experiments conducted in different regions where it was determined the effect of these kinases on the function of neurotransmitter receptors mostly distributed in the nervous system.

Conclusions. The cys-loop receptors regulation by protein kinases occurs through the activation of other receptors (cross-talk) that are expressed at different stages of development and nervous system areas.

Key words. Cross-talk. Cys-loop receptors. Desensitization. Ionotropic receptor. Phosphorylation. Protein kinases.

III. Mecanismos de regulación cruzada “cross talk”

El reconocimiento extracelular de múltiples tipos de moléculas por receptores de membrana le permite a la célula adaptarse y responder a cambios en el microambiente que la rodea. La unión del ligando a su receptor, induce la activación de vías de señalización intracelulares que conllevan a la regulación de diversos procesos celulares y que deben desactivarse en un momento determinado. De esta manera, existen diversos mecanismos que pueden regular la función de un receptor: i) disminución de su función en respuesta a la unión continua del ligando (desensibilización homóloga); ii) potenciación o inhibición de la función en respuesta a la activación de proteínas cinasas (desensibilización heteróloga).

A. Desensibilización homóloga

En general, los mecanismos involucrados en la desensibilización de receptores de membrana se han estudiado en receptores acoplados a proteínas G (Kelly et al., 2008; Cho et al., 2010) y en menor medida en receptores ionotrópicos (Lévi et al., 1998; Rasmussen et al., 2002). En cultivos primarios de neuronas de la médula espinal de la rata, Lévi y sus colaboradores (1998) demostraron que la proporción de RGlyc expresados en la superficie celular disminuye bajo un tratamiento crónico de estricnina, debido a la acumulación de RGlyc en el interior celular (Rasmussen et al., 2002).

B. Desensibilización heteróloga

La desensibilización heteróloga de los RGly $\alpha 3$, en respuesta a la activación de la PKA, se demostró tanto en receptores nativos localizados en la médula espinal como en RGly $\alpha 3$ recombinantes expresados en la línea celular HEK293. La aplicación de prostaglandina E2 (PGE2) disminuyó las corrientes producidas por glicina en un 45%, efecto que se revirtió en presencia del péptido inhibidor de la PKA (PKAIP). Adicionalmente, la mutación de la Ser³⁴⁶-Ala³⁴⁶ (S346-A346), dentro de una secuencia consenso de fosforilación por PKA (residuos 344-347, Arg, Glu, Ser, Arg en el asa intracelular que conecta a los segmentos TM3-TM4), abolió completamente el efecto inducido por PGE2 (Harvey et al., 2004). En síntesis, la activación del receptor a PGE2, el EP₂, induce la activación de la PKA y la fosforilación del RGly $\alpha 3$. Asimismo, en un estudio reciente se demostró que la activación del receptor metabotrópico de serotonina R5-HT_{1A}, acoplado a proteínas G_i, incrementó las corrientes de glicina debido a una disminución en la actividad de la PKA y, en consecuencia, en el estado de fosforilación del RGly $\alpha 3$ (Manzke et al., 2010). No obstante, los mecanismos que regulan la función de RGly $\alpha 3$ expresados en la médula espinal no se determinaron.

El primer estudio en el que se determinaron los mecanismos que participan en la regulación del RGly en respuesta a la activación de la PKC, fue el realizado por Huang y sus colaboradores (2007). Por medio microscopía confocal y de registros electrofisiológicos en la modalidad de célula completa, estos autores demostraron que la activación de la PKC disminuye las corrientes de glicina, mediadas por RGly $\alpha 1$, debido a la internalización de estos receptores.

IV. La retina de los vertebrados

La retina constituye la capa más interna del ojo de los vertebrados (Fig. 2) y su función es transformar un estímulo luminoso en uno eléctrico. La codificación de la información sensorial en la retina de los vertebrados ocurre por medio de los diversos tipos neuronales que la componen y que utilizan principalmente tres amino ácidos como neurotransmisores: el glutamato (neurotransmisor excitador), el GABA y la glicina (neurotransmisores inhibidores). El glutamato es el neurotransmisor de la vía vertical de la retina: células fotorreceptoras → células bipolares → células ganglionares, mientras que el GABA y la glicina son neurotransmisores de la vía horizontal: células horizontales, amacrinas e interplexiformes.

A. Respuestas ON y OFF en la retina

El registro electrofisiológico de las fibras que conforman al nervio óptico, axones de las células ganglionares, demostró que éstas son capaces de producir potenciales de acción en respuesta a un estímulo luminoso; sin embargo, el patrón de disparo fue diverso (Fig. 3-A; Hartline, 1938). Las fibras de tipo ON, producen una ráfaga de disparos inicial en respuesta al estímulo luminoso, disparando de forma constante cuando el estímulo está presente. Por otro lado, los axones de las células ganglionares ON-OFF responden al inicio del estímulo, se silencian posteriormente y vuelven a disparar una vez que el estímulo ha finalizado (Fig. 3-A). Por su parte, las fibras OFF responden de manera sostenida al término del estímulo (Fig. 3-A).

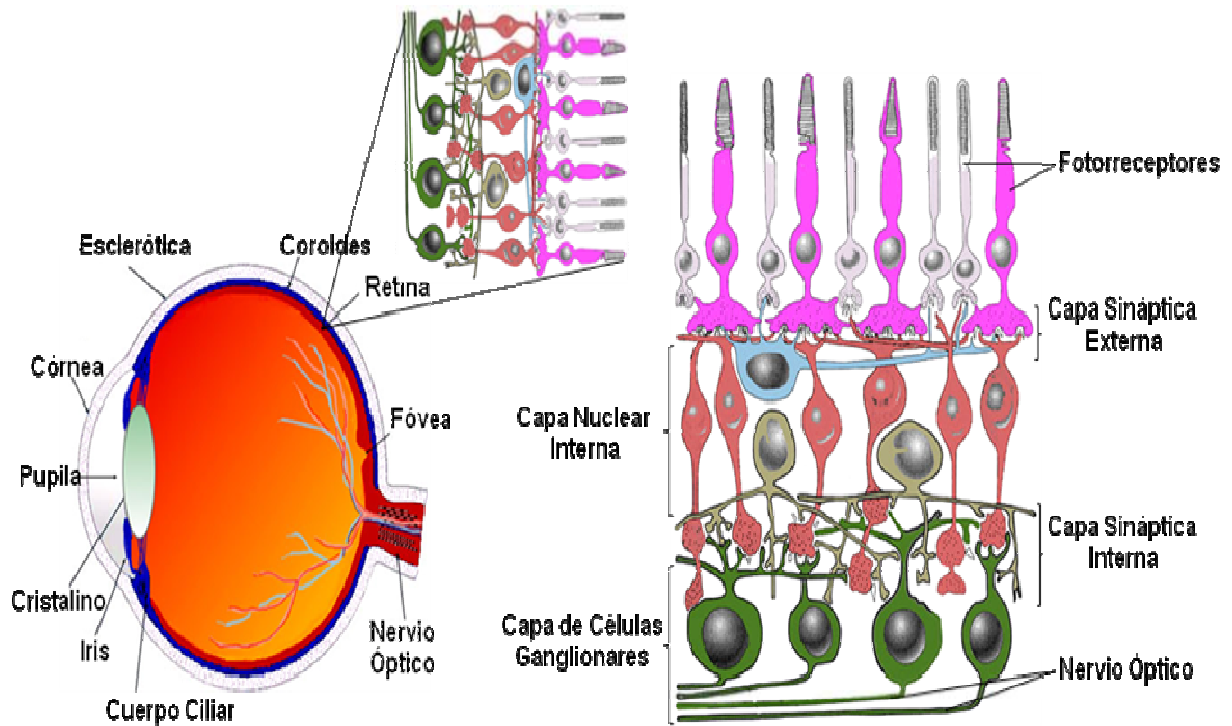


Fig. 2. ESQUEMA DEL OJO DE LOS VERTEBRADOS. La capa más interna del ojo está constituida por la retina, la cual está compuesta por seis tipos neuronales que se organizan en capas. La capa nuclear externa (CNE) está formada por los somas de los fotorreceptores (conos y bastones); la capa nuclear interna (CNI), en la que se encuentran los somas de las células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes y la capa de células ganglionares. Interconectando estas tres capas se hallan la capa sináptica o plexiforme externa (CPE; contactos sinápticos entre los fotorreceptores y las células de la CNI) y la sináptica interna (CPI; sinapsis entre las células de la CNI y las células ganglionares). Las células gliales de Müller atraviesan todas las capas de la retina y sus pies forman la membrana limitante interna. (Imágenes modificadas de: <http://lowvision.galeon.com/ojo/elojo.htm> y <http://www.skidmore.edu/~hfoley/Perc3.htm>).

Estudios de tipo fisiológico y morfológico revelaron que las células ganglionares ON y OFF se estratifican de manera diferente dentro de la CPI (Nelson et al 1978, Peichl and Wässle, 1981; Amthor et al, 1989a), lo que sugiere funciones específicas para cada subtipo de célula ganglionar en la retina (Fig. 3-B). Las dendritas de las células OFF ramifican dentro de la CPI, en proximidad con la capa nuclear interna, en donde establecen contactos sinápticos con las terminales de las células bipolares OFF. Las células ganglionares ON se extienden dentro de la CPI cerca de la capa de células ganglionares, contactando las terminales de las células bipolares ON (Nelson et al. 1978), mientras que los árboles dendríticos de las células ON-OFF, arborizan a todo lo largo de la CPI “patrón biestratificado” (Amthor et al, 1989b).

a. Campo receptivo de las células ganglionares de la retina

Hartline demostró que las células ganglionares responden a un estímulo luminoso tenue localizado en el centro del campo receptivo¹, mientras que un estímulo más intenso es necesario cuando la luz se aleja del centro del campo (Fig. 4). Con base en estos experimentos, Hartline concluyó que el campo receptivo de las células ganglionares está fijo en el espacio y que no se extiende más de 1 mm de diámetro. Sin embargo, el campo receptivo resultó ser más grande de lo que se

¹**Campo receptivo:** área de fotorreceptores que responden a un estímulo luminoso y que transmiten la señal a tipos específicos de células horizontales, bipolares, amacrinas y ganglionares.

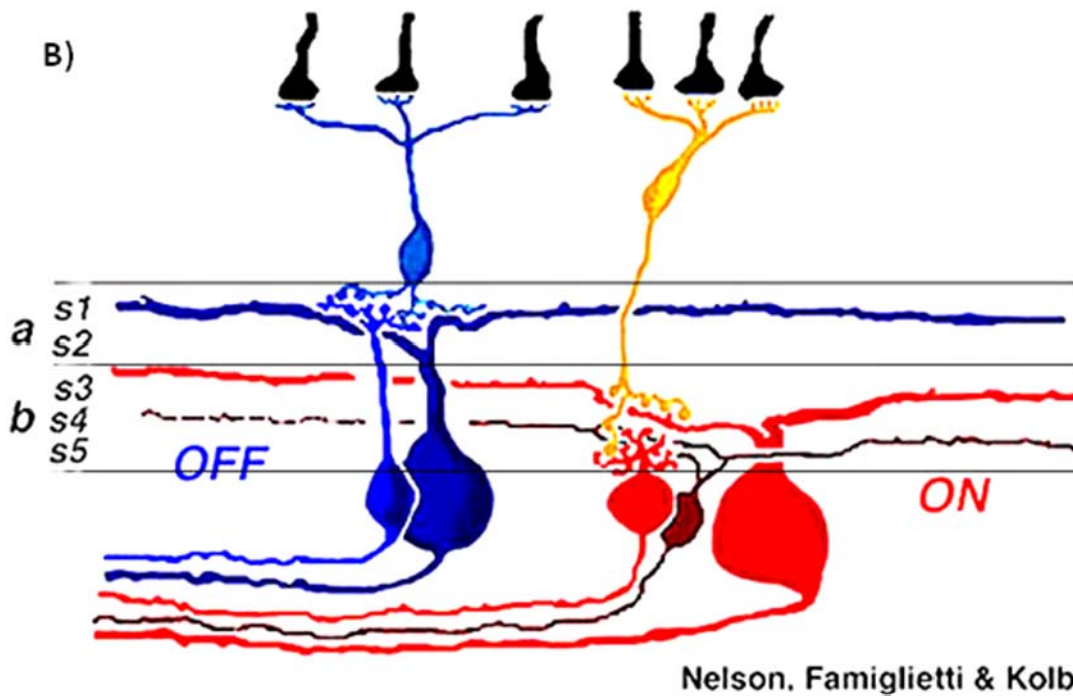
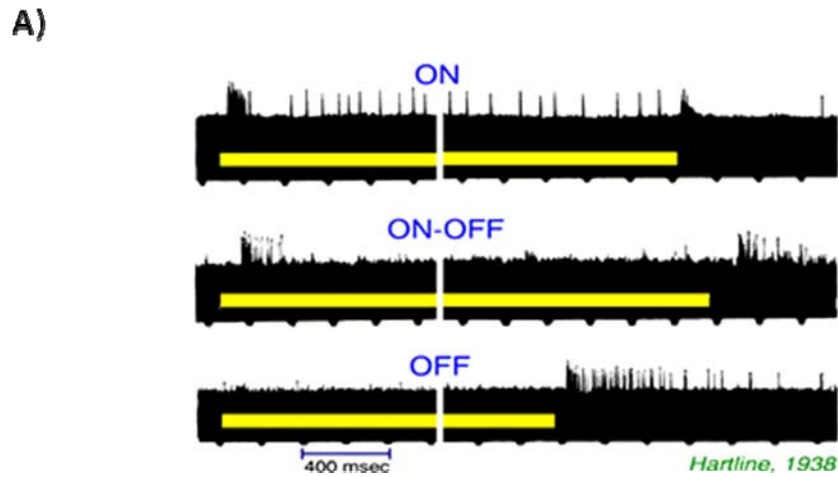


Fig. 3. A) Respuestas ON, OFF y ON-OFF de las células ganglionares de la retina. B) Estratificación de las células ganglionares de centro ON y OFF dentro de la CPI. Modificado de: [http://retina.umh.es/webvision/GCPHYS1.HTM#ON and OFF Responses](http://retina.umh.es/webvision/GCPHYS1.HTM#ON%20and%20OFF%20Responses)

esperaba para la propagación de la respuesta producida por un solo fotorreceptor, sugiriendo que existe procesamiento e integración de la señal en la retina. Asimismo, este autor notó otras características que sugerían una alta complejidad de este fenómeno: i) las respuestas se vuelven más rápidas y menos sostenidas conforme el estímulo luminoso se aleja del centro del campo receptivo (Fig. 4); ii) movimientos sutiles, mucho menores que el diámetro del campo receptivo de la célula (micras), pueden provocar una respuesta importante.

i. Campo receptivo central y periférico

Conforme el estímulo luminoso se mueve a través del campo receptivo de las células ganglionares, tanto la intensidad como la forma de su respuesta cambian. En este sentido, Kuffler (1953) observó que las respuestas producidas al estimular el centro o la periferia del campo receptivo son totalmente diferentes. En la figura 5a, un estímulo luminoso puntual, localizado cerca de la punta del electrodo, evoca una ráfaga de impulsos, mientras que el desplazamiento del estímulo hacia la periferia (0.5 mm) modifica el patrón de disparo (Fig. 5b). Asimismo, las respuestas producidas por un estímulo localizado en puntos intermedios del campo receptivo, entre el centro y la periferia, son diferentes. Las respuestas ejemplificadas en la figura 5, son características de células ganglionares de centro ON con periferia OFF. Por el contrario, las células de centro OFF disparan en respuesta a un estímulo periférico y se inhiben cuando se estimula el centro del campo receptivo. Estas propiedades de respuesta de las células ganglionares son las que establecen el campo receptivo centro-derredor (receptive field center-surround).

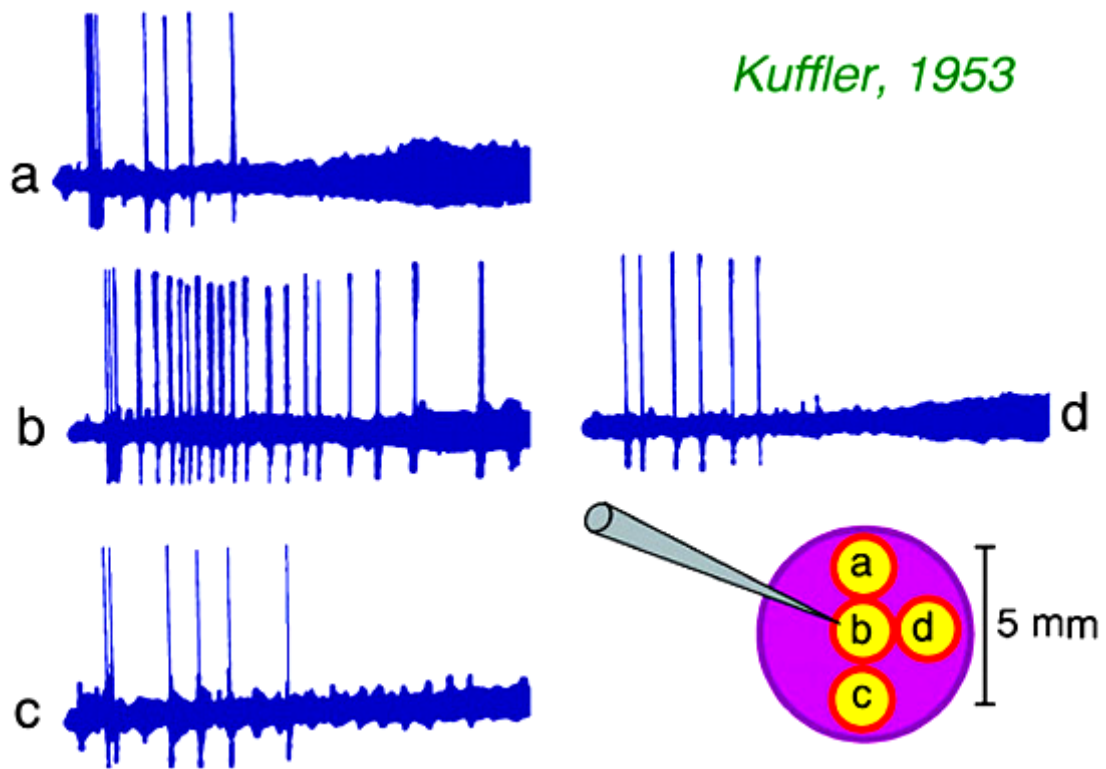


Fig. 4. Mapeo por medio de haces de luz puntuales en el campo receptivo central de las células ganglionares del gato. Tomado de: [http://retina.umh.es/webvision/GCPHYS1.HTM#ON and OFF Responses](http://retina.umh.es/webvision/GCPHYS1.HTM#ON%20and%20OFF%20Responses)

B. Transmisión glicinérgica en la retina

El GABA y la glicina son los principales neurotransmisores inhibidores de la retina de los vertebrados, localizándose principalmente en células amacrinas que cumplen funciones específicas para el procesamiento de las señales visuales (Pourcho, 1996). Relacionado con esto, las células amacrinas con campo receptivo amplio (wide field amacrine cells) establecen interacciones laterales dentro de la CPI y utilizan GABA como neurotransmisor (Lin and Masland et al. 2006), mientras que las células amacrinas con campo receptivo pequeño (small-field) son glicinérgicas y establecen interacciones locales entre las subláminas de la CPI: subláminas ON y OFF (Hsueh et al., 2008).

En la retina de los mamíferos, la [³H]glicina se acumula en el 10% de células bipolares dominadas por conos y en el 50% de células amacrinas, de las cuales, la mayoría son de campo receptivo pequeño (Fig.6): A3, A4, A7 (All) y A8 (Pourcho y Goebel, 1985, 1987; Jäger y Wässle, 1987). Las células amacrinas con campo receptivo pequeño, reciben la entrada sináptica de células bipolares, por medio de sinapsis en listón (ribbon synapses), así como de otras células amacrinas –tanto GABAérgicas como glicinérgicas- por sinapsis químicas convencionales, mientras que la salida sináptica establece contactos con células bipolares, otras células amacrinas y células ganglionares (Jusuf et al. 2005; Pourcho y Owczarzak, 1991a ,b; Sassoè-Pognetto et al.1994). Asimismo, ciertas células amacrinas glicinérgicas poseen procesos que contactan la capa plexiforme externa (CPE; Kolb y West, 1977). De los diferentes tipos de células amacrinas que utilizan

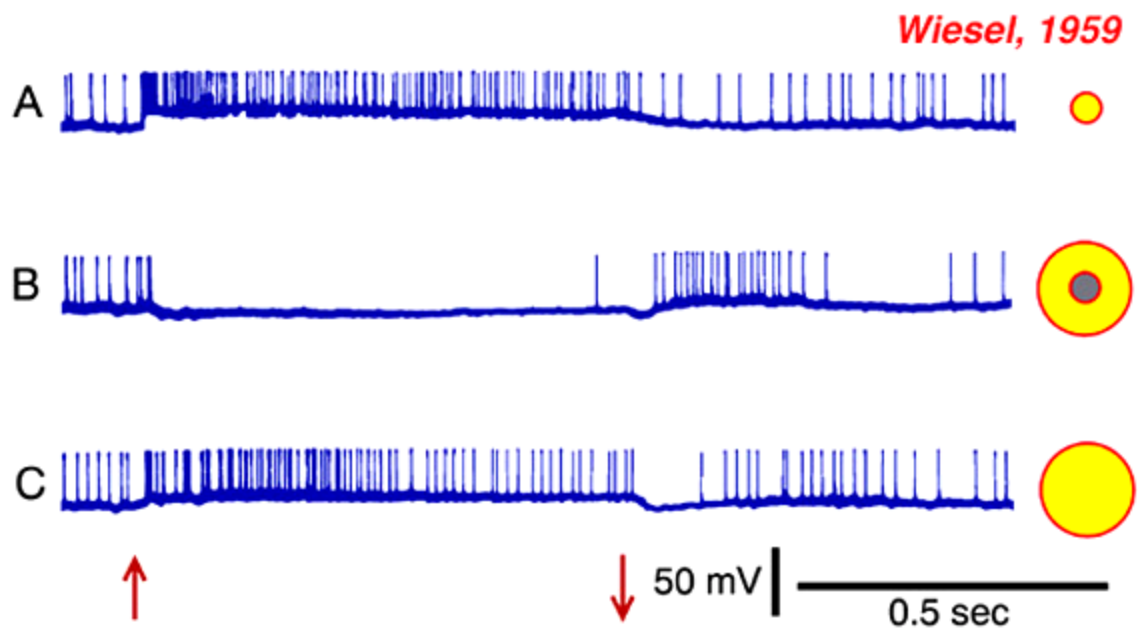


Fig. 5. La estimulación del campo receptivo periférico o central modifica el potencial de membrana de manera distinta.

glicina como transmisor, la célula amacrina AII es de interés particular, debido a que este tipo celular modula el paso de información de células bipolares dominadas por bastones hacia células ganglionares de centro OFF, mecanismo que parece ser necesario para la visión escotópica (Kolb y Nelson, 1983; Dacheux y Raviola, 1986).

a. La estricnina: antagonista de la transmisión glicinérgica

El alcaloide estricnina es la única herramienta farmacológica con la que se cuenta hasta el momento para estudiar el RGly y por ende, la transmisión glicinérgica en el SNC. En la retina aislada del gato, la superfusión de estricnina (2-40 μM) atenuó las respuestas producidas por un estímulo luminoso puntual de las células ganglionares β de centro ON, mientras que no tuvo efecto sobre la respuesta a la luz de las células ganglionares β de centro OFF ni en las células ganglionares de tipo α (Saito, 1981,1983). En contraste, la iontoforesis de estricnina en la retina intacta del gato reveló un efecto solamente sobre las células ganglionares de centro OFF (Ikeda y Sheardown, 1983; Müller et al., 1988). Finalmente, Caldwell et al. (1978) encontraron que la respuesta transitoria a la luz, de todos los tipos de células ganglionares, disminuye en presencia de estricnina. Así, los resultados obtenidos indican que el bloqueo de los diferentes subtipos del RGly presentes en la retina, altera las propiedades de los campos receptivos de las células ganglionares.

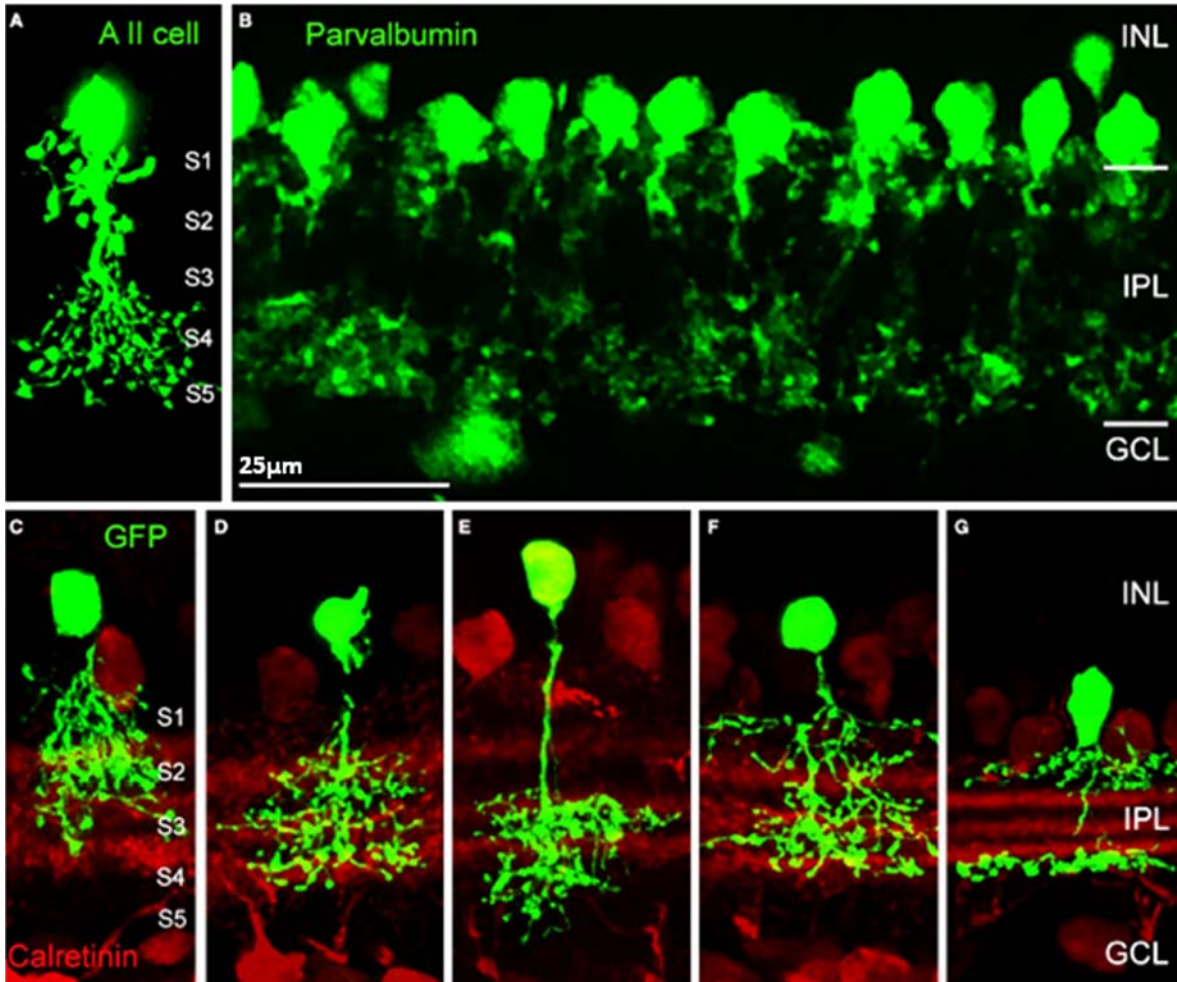


Fig. 6. MORFOLOGÍA DE CÉLULAS AMACRINAS GLICINÉRGICAS. (A) Sección vertical de una células amacrina AII de la retina del ratón que fue marcada con neurobiotina durante los registros electrofisiológicos. La capa plexiforme interna (CPI; IPL) está subdividida en 5 subláminas de grosor similar. (B) Disposición de las células amacrinas de la retina de la rata inmunomarcadas para parvalbúmina. (C-G) Células amacrinas glicinérgicas que expresan la proteína verde fluorescente en el ratón thy-1GFP-O. (C) Célula tipo 2. (D) Células tipo 3. (E) Células Tipo 4. (F) Células Tipo 7. (G) Célula A8. Tomado de Wässle et al 2009.

b. Ratones transgénicos

El uso de ratones transgénicos que tienen eliminada (“knock-out”) o disminuida (“knock-down”) la expresión de alguno de los genes que codifican para las diferentes isoformas de la subunidad α del RGly, permite estudiar la participación de receptores $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ó $\alpha 4$ en la transmisión glicinérgica de la retina de los mamíferos. El registro electrofisiológico de células ganglionares aisladas de la retina de un modelo de ratón espástico, que tiene disminuida la expresión de la subunidad $\alpha 1$ del RGly (Becker, 1990; Pinto et al., 1994), reveló que estas células tienen anomalías en la organización de su campo receptivo (Stone y Pinto, 1992). Mientras que el campo receptivo de las células ganglionares del ratón silvestre presenta una organización concéntrica centro-derredor (Balkema y Pinto, 1982; Stone y Pinto, 1993), el campo receptivo de las células ganglionares del ratón espástico no responden a estímulos periféricos (Stone y Pinto, 1992). Sin embargo, el efecto antagónico que tiene la estimulación del campo receptivo periférico sobre el campo central, permanece intacto en el ratón espástico. Las respuestas del campo receptivo central de las células ganglionares de un ratón silvestre, consisten de un componente temporal y uno sostenido; no obstante, en el ratón espástico las respuestas muestran sólo el componente transitorio. En conclusión, la transmisión glicinérgica controla las respuestas tanto temporales como espaciales de las células ganglionares de la retina por medio de RGly $\alpha 1$. Para intentar dilucidar el circuito mediado por RGly $\alpha 1$, que controla las respuestas de las células ganglionares observadas en el ratón espástico, el grupo de Wässle demostró que el circuito glicinérgico, células amacrinas tipo All → células bipolares de conos OFF, está mediado por RGly con cinéticas rápidas, lo

cual se traduce en una respuesta sináptica temporal. Adicionalmente, las células bipolares de bastones también expresan RGly $\alpha 1$, mientras que las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ no se localizan en ningún tipo de célula bipolar (Ivanova et al., 2006). Por otra parte, en un estudio relativamente reciente, Weiss et al. (2008) demostraron que las células amacrinas All exhiben corrientes postsinápticas inhibitoras espontáneas (sIPSCs) que son abatidas en ratones que carecen del gen que codifica para la subunidad $\alpha 3$ del RGly ($Glr\alpha 3^{-/-}$); no obstante, cuando se eliminan los genes $Glr\alpha 1^{spd-ot}$ (subunidad $\alpha 1$) ó $Glr\alpha 2^{-/-}$ (subunidad $\alpha 2$), las sIPSCs no se afectan. Además, las respuestas electrofisiológicas producidas por las células amacrinas con campo estrecho “narrow field amacrine cells”, de tipo 5, 6, y 7, se eliminó en ratones que no expresan RGly $\alpha 2$. Estos resultados indican que las sIPSCs producidas por las células amacrinas All están mediadas por RGly $\alpha 3$, mientras que en células amacrinas con campo estrecho, la glicina actúa sobre RGly $\alpha 2$. Similarmente, las células amacrinas desplazadas, con campo receptivo amplio, expresan preferentemente RGly $\alpha 2$ y $\alpha 4$ (Majumdar et al. (2009). Así, la expresión diferencial de RGly en tipos específicos de células bipolares, amacrinas y ganglionares, determina el grado de inhibición de circuitos específicos en la retina. En este sentido, se sabe que las células amacrinas All regulan la transmisión temporal “light through pathways”, mientras que otros tipos de células amacrinas lo hacen de forma sostenida (Masland, 2001; Wässle, 2004).

C. Localización del RGly en la retina

La diversidad de tipos de células amacrinas glicinérgicas presentes en la retina, concuerda con la heterogeneidad de RGly identificados en este tejido. Hasta la

fecha, se ha identificado la presencia de las cuatro isoformas de la subunidad α (α_1 - α_4) en sinapsis específicas de la retina de los mamíferos (Haverkamp et al. 2003; 2004; Heinze et al. 2007; Sassoè-Pognetto et al. 1994). La localización inmunocitoquímica del RGly en la retina de los mamíferos, se determinó inicialmente con la utilización de tres anticuerpos monoclonales (Pfeiffer et al., 1984; Schröder et al., 1991; Pérez-León y Salceda, 2000). Estos estudios revelaron la presencia del RGly en la capa plexiforme interna (CPI) de la retina, mientras que estudios de microscopía electrónica definieron su presencia en la membrana post-sináptica de las células amacrinas (Grünert y Wässle, 1993; Sassoè-Pognetto et al., 1994; Sassoè-Pognetto y Wässle, 1997). Adicionalmente, por medio de microscopía de luz y electrónica se colocó a la proteína periférica de membrana gefirina con la subunidad α del RGly (Pourcho y Owczarzak, 1991, a, b). Recientemente, se han utilizado tres anticuerpos policlonales que son específicos para las isoformas α_2 , α_3 y α_4 (Haverkamp et al., 2003, 2004; Jusuf et al., 2005). Las cuatro isoformas de la subunidad α (α_1 - α_4) estudiadas hasta el momento, se localizan en diferentes estratos de la CPI y muy raramente se localizan en el mismo sitio postsináptico, lo que sugiere que los RGlys constituidos por las diferentes isoformas de la subunidad α están involucrados en diferentes circuitos de la retina de los mamíferos (Heinze et al., 2007). La subunidad α_1 del RGly se distribuye predominantemente en células bipolares y en ciertos subtipos de células ganglionares (Grünert y Wässle, 1993; Greferath et al., 1994; Grünert y Ghosh, 1999; Lin et al., 2000), mientras que la subunidad α_2 se localiza en células amacrinas y prácticamente en todas las células ganglionares. Por su parte, las

subunidades $\alpha 3$ y β del RGly están ampliamente distribuidas en toda la CPI de la retina (Greferath et al., 1994). En la retina del ratón, una subpoblación de células amacrinas que sintetiza y libera acetilcolina expresa receptores formados por la subunidad $\alpha 4$ (Lin et al., 2000).

Adicional a la presencia del RGly en diferentes tipos neuronales de la retina, Pérez-León y Salceda (2000) demostraron por primera vez que las células gliales de Müller de la retina de la rana y de la rata expresan este receptor. Posteriormente, en la retina de la rana toro se demostró que la glia de Müller expresa RGlys formados por la subunidades $\alpha 1\beta$ y no por la $\alpha 2$; sin embargo, su significado se desconoce (Lee et al., 2005).

JUSTIFICACIÓN

El estudio del efecto de la PKA y PKC sobre la función del RGly se ha realizado en el receptor purificado, en sistemas de expresión diversos, así como en células de diferentes regiones del sistema nervioso en cultivo. Los datos obtenidos hasta el momento son aparentemente contradictorios, debido a que la activación de estas cinasas puede tanto potenciar como inhibir las corrientes producidas por glicina, dependiendo de la preparación que se haya utilizado. Las diferencias parecen deberse a la expresión de RGlys constituidos por subunidades α distintas, isoformas de la PKA y PKC presentes en regiones específicas del sistema nervioso, así como a la existencia de componentes del citoesqueleto específicos que determinan la accesibilidad de las cinasas a la membrana plasmática. Con el objetivo de conocer cuáles son los mecanismos celulares que participan en la regulación del RGly en un sistema intacto, estudiamos el efecto que tiene la activación de la PKA y PKC sobre la unión específica de [3 H]glicina y [3 H]estricnina al RGly, el estado de fosforilación y la internalización del receptor en la retina intacta de la rata.

HIPÓTESIS

La unión específica de [³H]glicina y [³H]estricnina se modifica por la activación de la PKA y PKC, debido a la fosforilación y posible internalización del receptor de glicina.

OBJETIVO

Identificar los mecanismos celulares que rigen la regulación del RGly en respuesta a la activación de la PKA y PKC en la retina de la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar la unión de [³H]glicina y [³H]estricnina al RGly en la retina aislada de la rata.
2. Determinar el efecto que tiene la activación de la PKC y de la PKA en la unión específica de [³H]glicina y [³H]estricnina en la retina de la rata.
3. Estudiar si la activación de la PKA y/o de la PKC induce la fosforilación del RGly.
4. Determinar si la activación de la PKA y/o de la PKC induce la internalización del RGly.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Ensayo de unión de ligandos radioactivos

Se utilizaron ratas Long- Evans adultas (170-200g) adaptadas a la oscuridad durante 2 horas, se sacrificaron por decapitación, se extrajeron los ojos y se disectó la retina. Para los ensayos de unión de ligandos radioactivos, el tejido se incubó durante 40 min a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ en un medio Ringer Krebs sin Na^+ (en mM: MgSO_4 1.17; KH_2PO_4 1.2; KCl 4.7; CaCl_2 2.5; glucosa 5.6 y cloruro de colina 118) en presencia de diferentes concentraciones de [^3H]glicina ó [^3H]estricnina. Al finalizar los 40 minutos, el tejido se pasó a un medio nuevo con glicina 1 mM ó estricnina 100 μM y se incubó por 40 minutos adicionales ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) para determinar la unión específica. Después de la incubación, el tejido se lavó con medio frío, se pesó y se disolvió en 0.5 ml de SDS al 1.0%. La radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido. La unión específica se definió como la cantidad del radioligando que se desplaza por 1 mM ó 100 μM de glicina ó estricnina fría, respectivamente (Pérez-León y Salceda, 1995).

2. Efecto de las proteínas cinasas sobre la unión específica

El efecto de la PKA y PKC sobre la unión específica, se determinó en presencia de activadores (forskolina, 8Br-AMPC) o inhibidores (H89) de la PKA o PKC (ésteres de forbol; estaurosporina y bisindolilmaleimida VII). Los fármacos se añadieron al mismo tiempo que los radioligandos y la unión se determinó después de 40 minutos de incubación. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de luz roja tenue.

3. Inmunoprecipitación

La retina se incubó en las mismas condiciones que aquellas descritas para determinar el efecto de las cinasas sobre la unión específica y se transfirió a un amortiguador de lisis 1:3 (p/v) (Buffer RIPA-Tris: en mM: EGTA 2; NaCl 316; Na₂MoO₄ 20; NaF 50; Tris-HCl 20; Na₃VO₄ 100, PMSF 100 y EDTA 100; 0.1% de leupeptina y aprotinina; SDS al 0.2% y Tritón-X100 al 2 %). El homogenizado se mantuvo en agitación constante durante 3 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 20, 800 x g durante 10 minutos y el sobrenadante (50 µg proteína) se vertió a tubos que contenían 10 µg del anticuerpo anti-GlyR H-70 (anticuerpo inmunoprecipitante hecho en conejo que reconoce a todas las subunidades α del RGly) previamente acoplado a perlas de sefarosa– proteína A (3.3 mg/20 µl). La muestra se incubó a 4°C en agitación constante por 12-15 horas y se centrifugó a 20, 800 g por dos minutos; la muestra se lavó en tres ocasiones con Buffer de lisis (sin SDS y Tritón X-100 al 1%). Al complejo proteína A- GlyRH-70-RGly se le agregó solución de Laemmli (Laemmli, 1970), se hirvió durante 7 minutos y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras (Laemmli, 1970). Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de Millipore, se bloqueó con leche (90 minutos) y se incubó durante toda la noche con un anticuerpo hecho en ratón que reconoce residuos de serina fosforilados (Chemicon International; 1:100). Posteriormente, se lavó la membrana del exceso del anticuerpo primario, se incubó por 90 minutos en presencia de un anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (Amersham Life Science; 1:100, 000)

y se reveló utilizando un sustrato comercial de la peroxidasa que exhibe quimioluminiscencia (Immobilon Western de Millipore; Burnette, 1981). El anticuerpo anti-GlyR-H70 reveló la presencia de una banda de 48-50 kDa (RGly). Las placas del revelado se sometieron a un análisis de densitometría (Programa AlphaEase FC) y los datos se analizaron en el programa de cómputo GraphPad Prism5 (San Diego, CA).

4. Fraccionamiento subcelular

El tejido se incubó en las mismas condiciones descritas para determinar el efecto de las cinasas sobre la unión específica, se aislaron membranas microsomales y plasmáticas (Fig. 7) y se inmunoprecipitó al RGly como previamente se ha descrito. Las fracciones membranales obtenidas: microsomas y membranas plasmáticas, se resuspendieron en 200 μ l de Buffer Tris-HCl; Sacarosa 0.25 M pH 7.4 que contiene antiproteolíticos (Buffer Tris-S) y se caracterizaron por la determinación de la actividad de enzimas marcadoras: citocromo c-reductasa (Rickwood, 1993), glutamato deshidrogenasa (Schmidt and Schmidt, 1983) y fosfatasa alcalina (Sigma procedimiento no. 104), así como por la presencia de proteínas marcadoras de la fracción plasmática (subunidad α de las integrinas) y endosomal (Rab 11a) localizadas por Western blot.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (1951), usando un kit comercial (Bio-Rad Headquarters Hércules, California) y albúmina de suero bovino como estándar. La densidad óptica se midió en un lector de microplacas a 690 nm.

El análisis de los estudios cinéticos se realizó por medio de la ecuación de Hill ($Y=B_{max} \cdot X^h / (K_d^h + X^h)$) y de la gráfica de Scatchard, utilizando el programa computacional GraphPad Prism 5. La significancia estadística se determinó tanto con la prueba de t y como por un ANOVA de una vía, seguido por la prueba *post hoc* de Dunnett's.

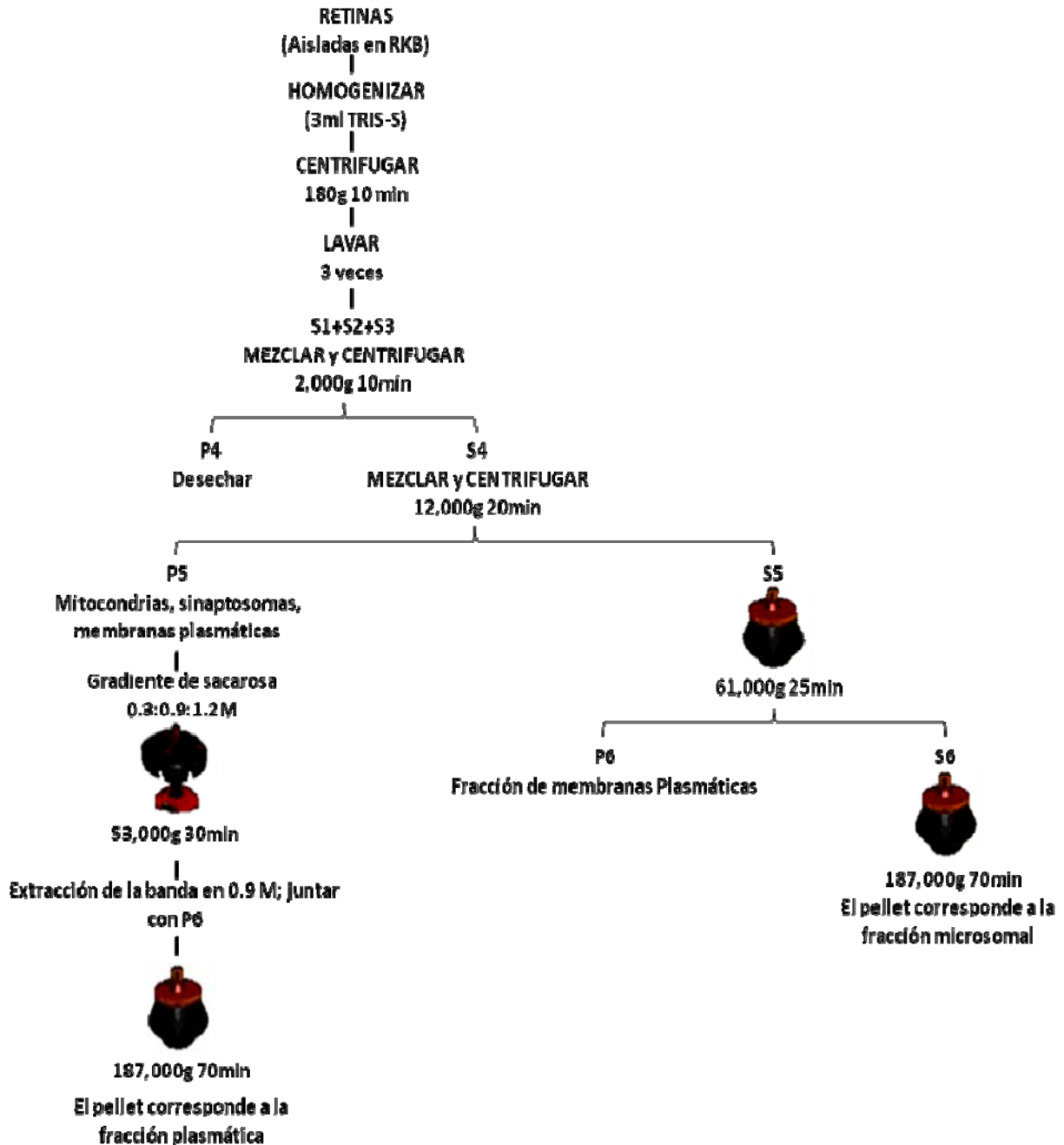


Fig. 7. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR. Se siguió el procedimiento descrito por McKeel y Jarett (1970) con ciertas modificaciones. El tejido (30 retinas) se incubó en presencia de activadores o inhibidores de la PKA o PKC, se homogenizó en buffer Tris-S y se centrifugó a distintas velocidades y tiempos. El RGIy se inmunoprecipitó de las fracciones microsomales y plasmáticas (50 µg de proteína total para cada caso), y se identificó por Western blot. P; pellet; S; sobrenadante.

RESULTADOS

Los resultados centrales del trabajo se publicaron en la revista SYNAPSE; se anexa copia del manuscrito.

Glycine Receptor Internalization by Protein Kinases Activation

MIGUEL ÁNGEL VELÁZQUEZ-FLORES* AND ROCÍO SALCEDA

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., México

KEY WORDS Cys-loop glycine receptor; radioligand binding assay; glycine receptor phosphorylation; ionotropic receptor internalization; receptor cross-talk

ABSTRACT Although glycine-induced currents in the central nervous system have been proven to be modulated by protein kinases A (PKA) and C (PKC), the mechanism is not well understood. In order to better comprehend the mechanism involved in this phenomenon, we tested the PKA and PKC activation effect on the specific [³H]glycine and [³H]strychnine binding to postsynaptic glycine receptor (GlyR) in intact rat retina. The specific binding constituted about 20% of the total radioligand binding. Kinetic analysis of the specific binding exhibited a sigmoidal behavior with three glycine and two strychnine binding sites and affinities of 212 nM for [³H]glycine and 50 nM for [³H]strychnine. Specific radioligand binding was decreased (60–85%) by PKA and PKC activation, an effect that was blocked by specific kinases inhibitors, as well as by cytochalasin D. GlyR expressed in the plasma membrane decreased about 50% in response to kinases activation, which was consistent with an increase of the receptor in the microsomal fraction when PKA was activated. Moreover, immunoprecipitation studies indicated that these kinases lead to a time-dependent receptor phosphorylation. Our results suggest that in retina, GlyR is cross-regulated by G protein-coupled receptors, activating PKA and PKC. **Synapse 65:1231–1238, 2011.** © 2011 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Inhibitory glycinergic neurotransmission is mediated by the glycine receptor (GlyR), which is a ligand-gated chloride channel of the Cys-loop family. The heteromeric receptor consists of two α (α_1 – α_4) and three β subunits (Grudzinska et al., 2005), having four glycine and two strychnine binding sites. A defining feature of this family is the presence of an extracellular “Cys-loop” structure, which is important for ligand binding. Also, Cys-loop receptors possess an intracellular loop linking TM3-TM4 that has several putative sites of modulation by protein kinases (Kittler and Moss, 2003; Ruiz-Gómez et al., 1991; Swope et al., 1999; Wiesner and Fuhrer, 2006). In this regard, Ruiz-Gómez et al. (1991) reported protein kinases C (PKC)-dependent serine S391 phosphorylation of the α_1 -subunit in the GlyR purified from the spinal cord. In addition, glycine currents are decreased by PKC activation in spinal cord neurons (Albarrán et al., 2001; Tapia et al., 1997), as well as in recombinant GlyRs (Albarrán et al., 2001; Tapia et al., 1997; Vaello et al., 1994); these currents increased in neurons isolated from different brain regions (Nabekura et al., 1996; Schönrock and Bor-

mann, 1995; Xu et al., 1996). Protein kinase A (PKA) activation increased glycine currents in the spinal cord (Song and Huang, 1990; Tapia et al., 1997; Vaello et al., 1994) and decreased those obtained in substantia nigra neurons (Inomata et al., 1993). PKA down-regulates the open probability of the GlyR in ventromedial hippocampal neurons (Agopyan et al., 1993), exerting the opposite effect in trigeminal neurons (Song and Huang, 1990). In retina, both PKC and PKA activation decreased the decay time constant of glycine currents (Han and Slaughter, 1998); however, the mechanism is unknown. In order to better understand the mechanism of GlyR modulation in retinal synaptic transmission, we analyzed the effect of PKA and PKC activation on GlyR specific radioligand bind-

Contract grant sponsor: PAPIIT/UNAM; Contract grant numbers: IN 207810-3; Contract grant sponsor: CONACYT; Contract grant numbers: 203289, I0006.

*Correspondence to: Miguel A. Velázquez-Flores, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México Apdo. Postal 70-253, 04,510 México, D.F., México.
E-mail: mvflores@email.ifc.unam.mx

Received 28 April 2011; Revision 27 May 2011; Accepted 31 May 2011

DOI 10.1002/syn.20963

Published online 7 June 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

ing, its phosphorylation, and its internalization in the intact rat retina.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male and female Long-Evans rats (170–200 g) were maintained under dark-light conditions (12:12 h). Long-Evans rats were inbred from a colony originally obtained from Charles River (Raleigh). All animals ($n = 100$) were handled according to the Association Research in Vision and Ophthalmology Statement on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Materials

[³H]glycine (56.4–60.0 Ci/mmol) and [³H]strychnine (23 Ci/mmol) were purchased from NEN Life Science Products (Boston, MA). Monoclonal mouse antibody (Cat. No. 146 011) clone mAb4a, against rat spinal cord glycine receptor (recognizes all GlyR subunits), was obtained from Synaptic Systems (Göttingen, Germany); polyclonal rabbit anti-GlyR (GlyR α H-70, Cat. No. s.c.-33,611) Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); integrin β 1 (M-106); s.c.-8978 is a rabbit polyclonal antibody that was also purchased from Santa Cruz Biotechnology; antiphosphoserine (mouse monoclonal IgG1, clone 4A4, Cat. No. 05-1000) from Millipore (Billerica, MA); mouse monoclonal antibody to rab11A (ab78337) was used (Abcam; Cambridge, UK). Protein A-Sepharose CL-4B was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Secondary antibodies, ECL antimouse IgG, peroxidase-linked, and ECL antirabbit IgG, peroxidase-linked were both purchased from GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Membranes of polyvinylidene difluoride (PVDF) were used (Millipore). Glycine, strychnine, cytochalasin D (Cyt D), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), bisindolylmaleimide VII (Bis VII), 8-bromoadenosine-3', 5'-cyclic monophosphate (8-Br-cAMP), forskolin, and H89 were purchased from Sigma-Aldrich.

Radioligand binding assay

Retinae from 2 h-dark-adapted rats were incubated at $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 40 min in Krebs medium (mM: choline chloride 118; KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.17; glucose 5.6; KHCO₃ 25) containing different concentrations of [³H]glycine (25–600 nM) or [³H]strychnine (10–200 nM) and then were incubated in the presence of 1 mM glycine or 100 μM strychnine for additional 40 min to determine the specific radioligand binding. After incubation, the tissue was rinsed with cold medium, weighed, and dissolved in 0.5 ml of 1% (v/v) of Sodium dodecyl sulfate (SDS). Radioactivity in the solubilized tissue was determined by liquid scintillation counting.

Specific binding was defined as the binding displaced by 1 mM or 100 μM nonradioactive glycine or strychnine, respectively (Pérez-León and Salceda, 1995).

Protein kinases effect on radioligands binding

To determine the effect of protein kinases on the specific binding, PKC or PKA activators (PMA, 8-Br-cAMP, and forskolin) and inhibitors (BisVII and H89) were added at the same time than radioligands and the binding was determined after 40 min. The whole experimental procedure was carried out under dim red light conditions.

Immunoprecipitation and immunoblotting

A retina (incubated as described above for the radioligand binding assay) was transferred into a lysis buffer (1:3 (p/v): RIPA-Tris buffer (mM: EGTA 2; NaCl 316; Na₂MoO₄ 20; NaF 50; Tris-HCl 20; Na₃VO₄ 100, PMSF 100 and EDTA 100; 0.1% of leupeptine and aprotinine; SDS 0.2% and Tritón-X100 2%) and maintained under constant shaking for 3 h at 4°C. Subsequently, the sample was centrifuged for 10 min at 20,800g and the supernatant (50 μg of protein) was incubated in the presence of 10 μg of anti-GlyR H-70 (immunoprecipitating antibody), previously coupled to sepharose pearls-protein A (0.5 mg/5 μl). Then, the sample was incubated at 4°C under constant shaking for 12–15 h and centrifuged at 20,800g for 2 min; the obtained pellet was washed three times with lysis buffer (without SDS but with 1% of triton X-100). The protein A-anti-GlyR H70-GlyR complex was denatured in Laemmli's sample buffer (Laemmli, 1970), resolved through 12% SDS polyacrilamide gels and electroblotted to PVDF membranes. Blots were stained with Ponceau S to confirm that protein loading was the same in all lanes. Membranes were soaked in PBS to remove the Ponceau S and incubated for 90 min in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% dried skimmed milk and 0.1% Tween 20 to block the nonspecific protein-binding sites. Afterwards, membranes were incubated for 14 h at 4°C with the primary antibody (mAb4a or antiphosphoserine) diluted in BSA 0.25%, Tween 20 0.1%, thimerosal 0.01% in TBS buffer. Then they were washed and incubated with the secondary antibodies (ECL antimouse or ECL antirabbit). The protein was detected using an ECL Western blot detection kit (Millipore). The mAb4a antibody revealed a band of 48–50 kDa (GlyR). The blots were subjected to a densitometry analysis and data were analyzed using GraphPad Prism5 software (San Diego, CA).

Subcellular fractionation

Subcellular fractionation was performed according to McKeel and Jarett's protocol (1970) with the following modifications. Retinae ($n = 30$), incubated under the

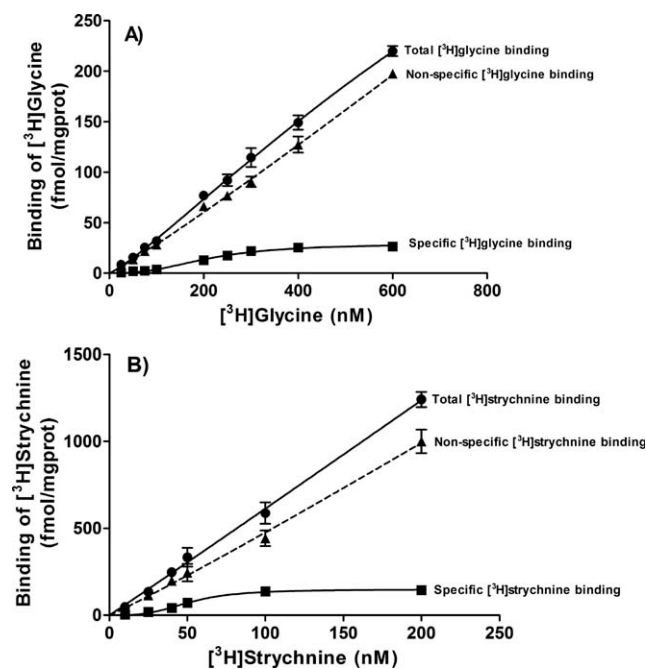


Fig. 1. Binding of $[^3\text{H}]$ glycine and $[^3\text{H}]$ strychnine to GlyR in the intact rat retina. Retinae from 2 h-dark-adapted rats were incubated 40 min at $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ in a Krebs medium in the absence of Na^+ containing different $[^3\text{H}]$ glycine (25–600 nM) or $[^3\text{H}]$ strychnine (10–200 nM) concentrations after equilibrium binding was reached. Specific radioligand binding represents the difference between total and nonspecific binding, being determined in the presence of 1 mM glycine or 100 μM strychnine, respectively. The whole experimental procedure was carried out under dim red light conditions. Values represent mean \pm SEM from seven experiments.

same conditions described for the immunoprecipitation assay, were homogenized in buffer A (Tris-HCl 0.01 M, pH 7.6; sucrose 0.25 M, EGTA 1 mM, benzamidine 2 mM, bacitrin 1 mg/ml, soybean trypsin inhibitor 0.1 mg/ml, pepstatin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptin 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and aprotinin 20 U/ml), and centrifuged at 180g for 10 min; the pellet was washed three more times. The mixed supernatants were centrifuged for 10 min at 2000g. The resulting supernatant was centrifuged at 12,000g for 20 min to obtain: mitochondriae, synaptosomes, and plasma membranes (P1). The supernatant obtained was centrifuged at 61,000g for 25 min to obtain a plasma membrane component (P2) remaining in this fraction. Microsomal membranes were sedimented at 187,000g for 70 min; simultaneously, P1 was placed in a sucrose gradient (0.3 M: 0.9 M: 1.2 M) and centrifuged for 30 min at 53,000g to obtain the plasma membrane fraction, which was mixed with P2. Both, the microsomal and plasma membranes, were solubilized in RIPA-Tris buffer, immunoprecipitated and immunoblotted as described above. Subcellular fractions were characterized by determining the activity of marker enzymes: cytochrome-c reductase (Rickwood, 1993), alkaline phosphatase (Sigma procedure no. 104), and glutamate dehydrogenase (Schmidt and Schmidt, 1983), and the presence of plasma membrane (integrin $\beta 1$) and micro-

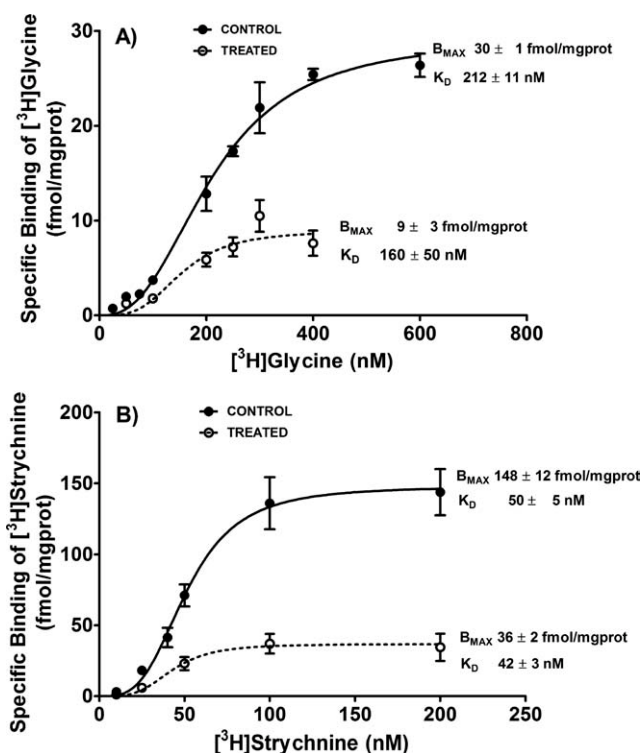


Fig. 2. $[^3\text{H}]$ glycine (A) and $[^3\text{H}]$ strychnine (B) binding kinetic in the whole rat retina. Equilibrium radioligand binding was reached at 40 min incubation and then the tissue was incubated in the dark for additional 40 min at $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ with different $[^3\text{H}]$ glycine (25–600 nM) or $[^3\text{H}]$ strychnine (10–200 nM) concentrations in the absence (solid lines) or presence of 200 nM PMA (dashed lines). The best fit of the radioligand binding kinetic was obtained by the Hill equation and the allosteric Monod–Wyman–Changeux model. Data are the mean \pm SEM from seven experiments.

somal (Rab 11a) marker proteins was demonstrated by Western blot.

Protein concentration was determined with a commercial kit (Bio-Rad Headquarters Hercules, CA) using bovine serum albumin as the standard (Lowry et al., 1951).

Kinetic analysis

After Scatchard analysis (Segel, 1975), the sigmoidal behavior of radioligand binding was studied by different equations; the best fit was obtained by the Hill equation ($Y = B_{\text{max}}X^h/(K_d^h + X^h)$) and the allosteric Monod–Wyman–Changeux model.

Statistical significance was determined by either the *t*-test or one-way ANOVA analysis, followed by the Dunnett's post hoc test.

RESULTS

Kinetic characterization of the specific $[^3\text{H}]$ glycine and $[^3\text{H}]$ strychnine binding in the intact rat retina

Since radioligand binding assay allows us to determine the proportion of surface membrane receptors, we char-

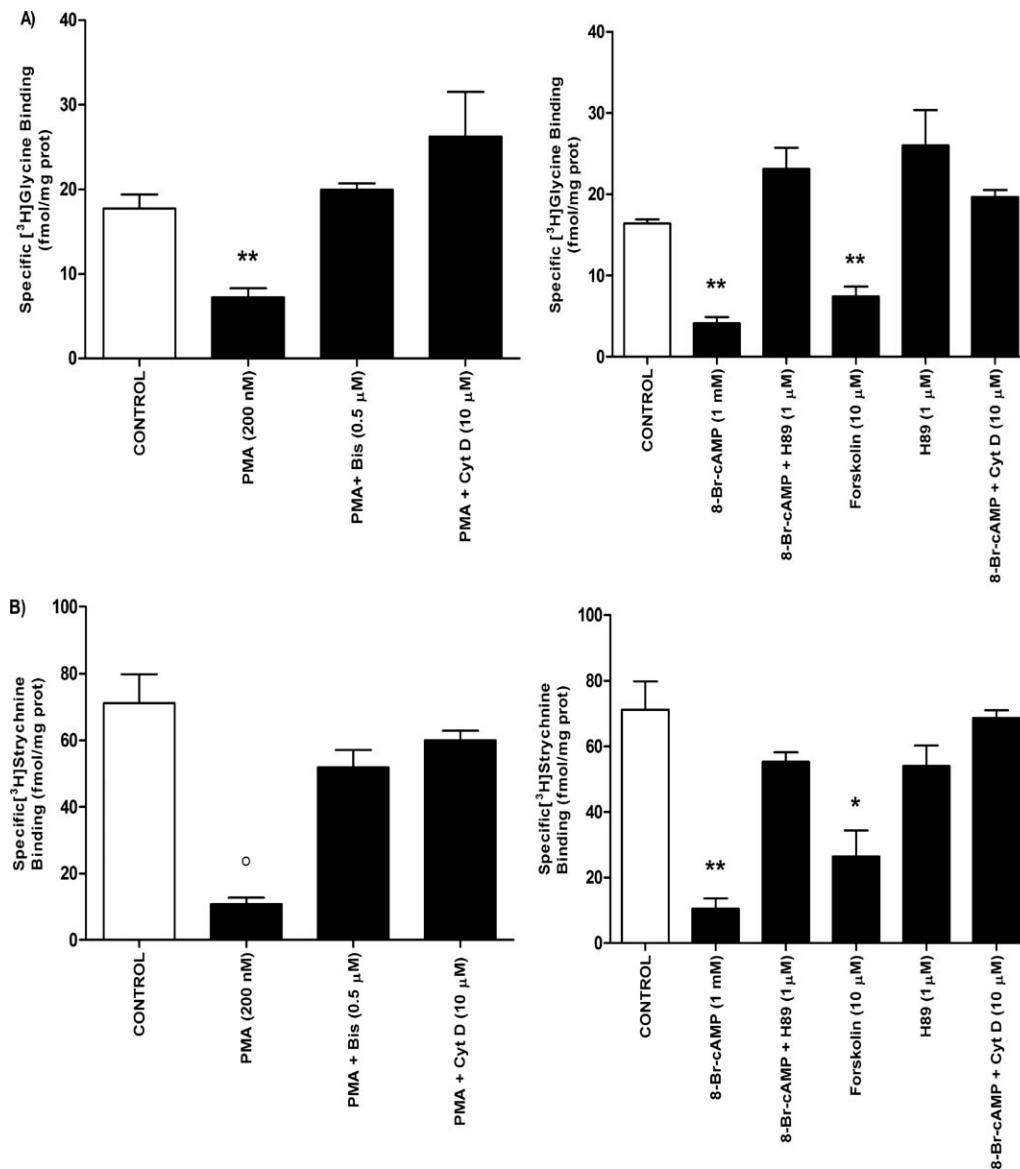


Fig. 3. Effect of PKC and PKA on the specific [³H]glycine and [³H]strychnine binding. Once the radioligands binding reached the equilibrium, tissue was incubated at (20 ± 1)°C for additional 40 min with 250 nM of [³H]glycine or 50 nM of [³H]strychnine in the presence

of PKC or PKA activators or inhibitors; the effect of cytochalasin D and carbachol was also tested. Values represent mean ± SEM from seven experiments *($P < 0.014$; t student vs. control); **($P < 0.0001$; t student vs. control); ^o($P < 0.0005$; t student vs. control).

acterized the specific [³H]glycine and [³H]strychnine binding to the GlyR in intact rat retina. To determine the conditions in which the specific binding reaches equilibrium, we incubated whole rat retina for different time periods in the presence of the radioligand. Under these conditions, specific [³H]glycine or [³H]strychnine binding increased linearly, reaching a plateau at 30 min and remained constant up to 90 min; therefore, kinetic assays were performed at 40 min incubation. Specific [³H]glycine binding constituted 20% of the total binding (Fig. 1A). The specific [³H]glycine kinetic binding established at different radioligand concentrations (25–600 nM) revealed a sigmoidal behavior with a K_d of 212 ± 11 nM and three binding sites (Fig. 2A).

Specific [³H]strychnine binding represented 25% of the total radioligand binding (Fig. 1B), exhibiting a sigmoidal shape with a $K_d = 50 \pm 5$ nM and two binding sites (Fig. 2B).

Activation of PKC and PKA decreased the specific binding of [³H]glycine and [³H]strychnine to GlyR

Activation of PKC by PMA decreased the specific [³H]glycine and [³H]strychnine binding by 60% and 85%, respectively (Fig. 3). The specific PKC inhibitor BisVII (0.5 μM) prevented the PMA effect on radioligand binding. Likewise, PKA activation by 8-Br-

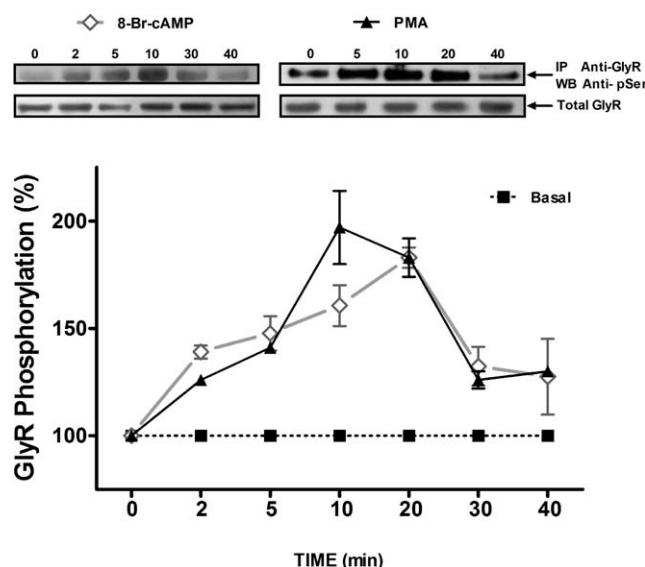


Fig. 4. GlyR phosphorylation induced by PKC or PKA activation. Dashed line indicates basal phosphorylation level. Representative Western blots of 8-Br-cAMP and PMA treated retinae are shown. Data are the mean \pm SEM from six experiments. One way ANOVA analysis showed a P value of 0.0006. The Dunnett's *post hoc* test was performed.

cAMP (1 mM) or by forskolin (10 μ M), also reduced specific radioligand binding significantly; 8-Br-cAMP effect was blocked with H89 (1 μ M), a specific PKA inhibitor (Fig. 3).

The decrease of specific radioligand binding could be associated with changes on the cell surface in the GlyR proportion, as well as modifications in ligand binding properties; therefore, we proved if the GlyR affinity and the maximum binding sites (B_{max}) for [3 H]glycine and [3 H]strychnine were modified in response to protein kinases activation. The K_d for the radioligands binding did not change in the presence of 8-Br-cAMP or PMA (K_d of 160 nM); however, activation of protein kinases led to a reduction in the B_{max} of both radioligands, without affecting their sigmoidal behavior (Fig. 2). Moreover, Cyt D (10 μ M), which inhibits actin polymerization required for endocytosis, blocked the effect of both kinases on the specific radioligands binding (Fig. 3). The B_{max} reduction, as well as the effect of Cyt D, suggests changes in the number of GlyRs in the plasma membrane.

GlyR phosphorylation

It is known that GlyR is phosphorylated in response to PKA and/or PKC activation in the spinal cord (Harvey et al., 2004; Ruiz-Gómez et al., 1991; Vaello et al., 1994). Our results revealed that retinal GlyR presented basal serine phosphorylation, which was enhanced in a time-dependent manner, following tissue incubation in the presence of PMA or 8-Br-cAMP. The phosphorylation state of GlyR increased as early as at

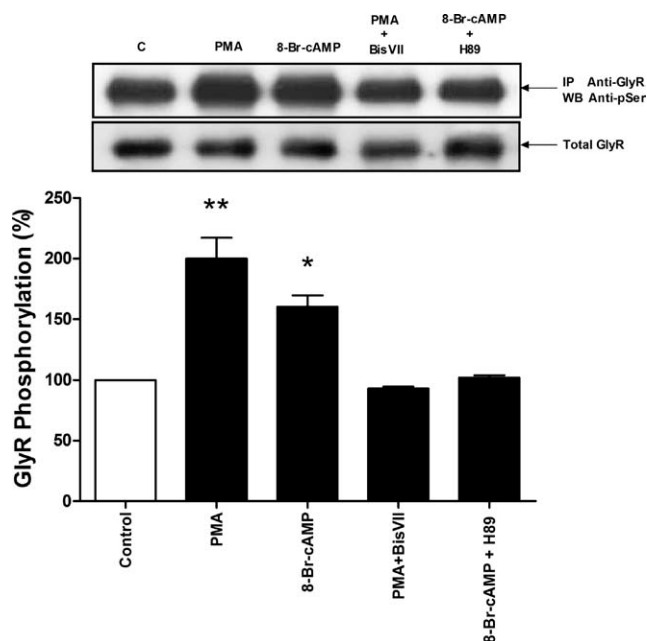


Fig. 5. GlyR phosphorylation depends on kinases activity. Tissue was incubated for 10 min in the absence or presence of PMA or 8-Br-cAMP, respectively. The presence of specific PKC (BisVII) or PKA (H89) inhibitors blocked the kinases effect. Data are presented as percentage of basal GlyR phosphorylation. Values are the mean \pm SEM from three experiments. *($P < 0.003$; t student vs. control); **($P < 0.004$; t student vs. control).

2 min incubation and reached its highest level at 10–20 min, decreasing thereafter (Fig. 4). Specific inhibition of PKA or PKC prevented GlyR phosphorylation without altering the basal one (Fig. 5).

GlyR internalization

Membrane receptor endocytosis is a well recognized mechanism that is involved in the down-regulation of transmembrane receptors. In order to determine whether GlyR is internalized in response to PKC and PKA activation, we analyzed the proportion of GlyR in plasma membrane and microsomal fractions. At 10 min incubation, we did not detect changes in the GlyR proportion in subcellular fractions compared with the control condition (data not shown). However, PKA activation decreased plasma membrane GlyR by (54 ± 8)% and increased it by (50 ± 3)% in the microsomal fraction at 40 min incubation (Fig. 6A). In addition, PKC activation also reduced the GlyR proportion in plasma membrane (41 ± 9 %), an effect that was blocked by BisVII (106 ± 9 %); however, microsomal GlyR proportion was neither altered in response to PKC activation nor in the presence of BisVII (Fig. 6B).

DISCUSSION

Glycine is the principal inhibitory neurotransmitter in the spinal cord and brain stem, exerting an inhibitory effect in the inner plexiform layer of the mam-

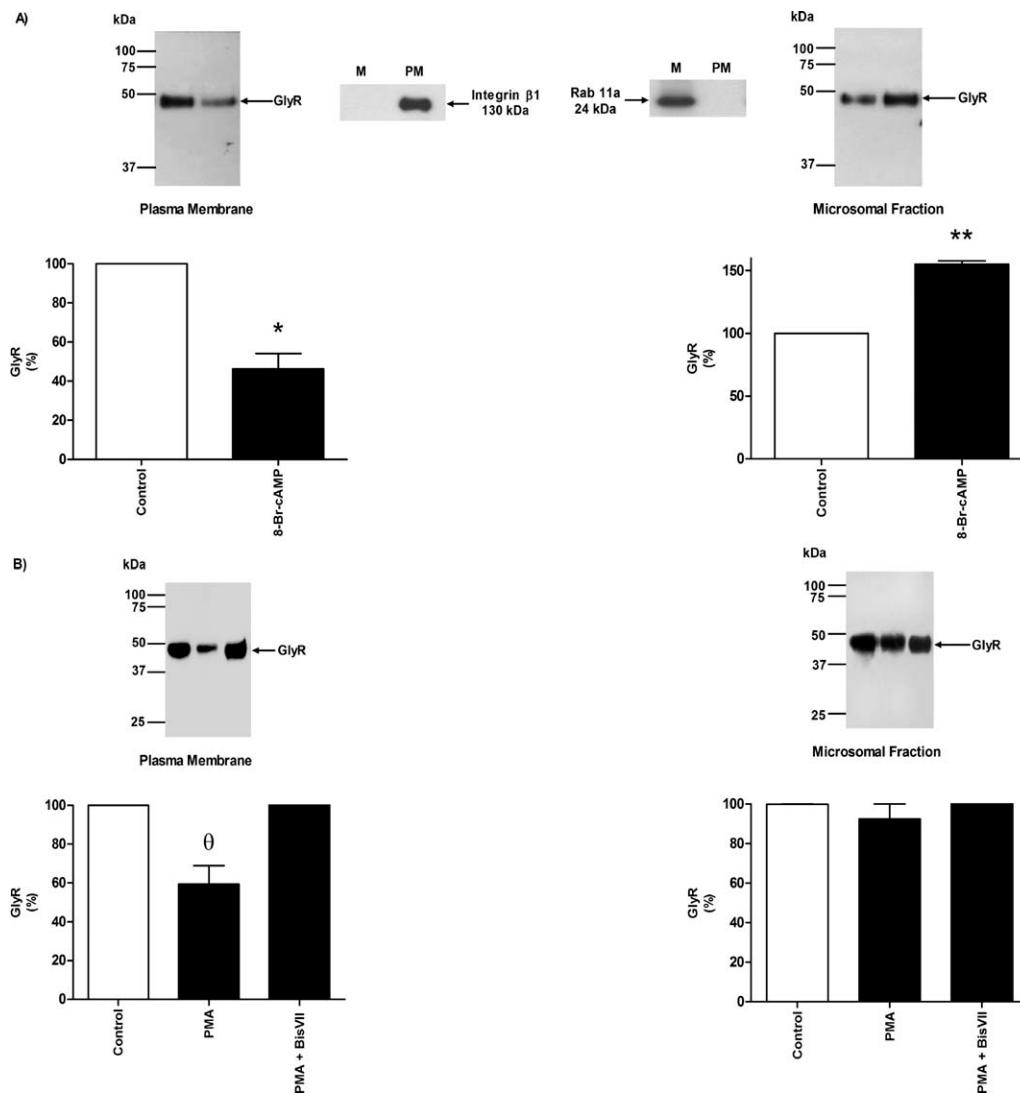


Fig. 6. PKA activation induced GlyR internalization. Retinae were incubated under the same conditions described to test the kinases effect on radioligands binding. **A:** Absence or presence of 1 mM 8-Br-cAMP or **(B)** 200 nM PMA or PMA + 0.5 μ M BisVII; then, membrane fractions were isolated as described in experimental procedures and 100 μ g of protein were used for immunoprecipitation with GlyR α H70 antibody. Plasma membrane (left) and microsomal

(right) GlyR was localized by Western blot with mAb4a antibody. Representative Western blots for GlyR and membrane fraction markers are presented. Plasma membrane (PM) and microsomal (M) protein markers were identified by means of integrin β 1 and Rab11A antibodies. Values represent the mean \pm SEM from three independent experiments. *($P < 0.002$; t student vs. control); **($P < 0.0002$; t student vs. control); ⁰($P < 0.01$; t student vs. control).

malian retina through the GlyR. In retinal ganglion cells, it was shown that PKC and PKA activation modified glycine currents (Han and Slaughter, 1998; Zhao et al., 2010), a process that could affect the excitatory neurotransmission in the retina. In order to elucidate the mechanisms controlling GlyR in response to protein kinases activation, we studied the effect of PKA and PKC activation on the specific [3 H]glycine and [3 H]strychnine binding to GlyR, as well as receptor phosphorylation and internalization induced by these kinases in the intact retina. Our results showed that [3 H]glycine and [3 H]strychnine binding to the GlyR has similar affinity to that reported in the spinal cord (Kishimoto et al., 1981;

Ruiz-Gómez et al., 1989; Young and Snyder, 1973) and the one found in retinal membranes (Borbe et al., 1981; Pérez-León and Salceda, 1995; Schaeffer and Anderson, 1981). However, kinetic binding analysis revealed a sigmoidal shape that was fitted to the allosteric Wyman–Monod–Changeux model, as well as to the Hill equation, displaying Hill coefficients (n_H) of 3 and 2 for glycine and strychnine binding, which suggests a cooperative system (Segel, 1975). Hill coefficients might indicate at least two binding sites acting together (Segel, 1975). These results are consistent with the electrophysiological response to glycine, in which the maximum gating efficacy of the GlyR is reached when three potential binding sites are occu-

pied (Beato et al., 2004). These sites could also be related to the expression of different α GlyR subunits (α_1 - α_4 , β) identified in the mammalian retina (Greferath et al., 1994; Heinze et al., 2007; Wässle et al., 2009). Under physiological conditions in which glycine concentrations in the synaptic cleft can change significantly, the cooperative behavior of the GlyR would allowed a better control of the excitatory neurotransmission.

Currently, there are some studies that indicate that spinal cord GlyRs are phosphorylated by both PKA and PKC (Harvey et al., 2004; Ruiz-Gómez et al., 1991; Vaello et al., 1994). In addition, electrophysiological evidence indicates that glycine currents are regulated by PKA and PKC in spinal cord (Harvey et al., 2004; Vaello et al., 1994), different brain regions (Nabekura et al., 1996; Schönrock and Borrmann, 1995; Xu et al., 1996), and retina (Han and Slaughter, 1998; Zhao et al., 2010). In this study, we show that activation of both kinases specifically decreased the radioligand binding to GlyR in the entire retina. Kinetic binding analysis revealed that PKA and PKC activation dramatically decreased the B_{\max} of the specific radioligands binding without altering the affinity of the GlyR for them, pointing to a decrease of the receptor on the cell surface. In agreement to this interpretation, Cyt D blocked the effect of kinases activation exerted on specific binding, indicating that GlyR is endocytosed in retina in response to PKA and PKC. In this respect, activation of both kinases resulted in the decrease of the GlyR in the plasma membrane with an increase in the microsomal fraction when PKA was activated, but not by PKC activation. Since PKA and PKC act on specific consensus amino acid sequences, GlyR phosphorylation for these kinases could represent different regulatory mechanisms. Further studies are required to identify the significance of GlyR phosphorylation by PKC.

Phosphorylation of G protein-coupled receptors at specific sites is a process that regulates their function by different mechanisms such as internalization (Alcántara-Hernández and García-Sáinz, 2005; Brandon et al., 2000; Kovacs et al., 2009; Pippig et al., 1993; Tang et al., 1998; Terunuma et al., 2010; Willoughby et al., 2007). It has also been shown that Cys-loop receptors, such as γ -aminobutyric acid (GABA_A), are phosphorylated by protein kinases, inducing their internalization (Chen et al., 2006; Kumar et al., 2010). Likewise, our results indicate that GlyR is regulated by similar mechanisms; however, evidence demonstrating that GlyR phosphorylation is required to induce GlyR internalization is necessary. In a physiological manner, GlyR modulation by protein kinases could occur through a cross-talk stimulation of G protein-coupled receptors. In fact, melatonin MT₂, prostaglandin E₂, and serotonin type

1A receptors activation modify glycine currents in different systems (Ahmadi et al., 2002; Manzke et al., 2010; Zhao et al., 2010).

In summary, our results showed, for the first time, that mammalian retinal GlyR is phosphorylated and internalized in response to PKA activation. Physiologically, activation of PKA would decrease GlyR at the cell surface which in turn would control the synaptic action of glycine. Although GlyR is phosphorylated by PKC activation, its significance is not yet understood. Further studies are necessary to determine the cross-talk mechanisms activating these protein kinases.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank G. Sánchez-Chávez for his technical assistance, Dr. M.E. Torres-Márquez for the academic support provided during this study, and Dr. G. Reyes-Cruz and Dr. D. Escalante-Alcalde for helping in supplying some of the antibodies used. This work was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of Miguel A. Velázquez-Flores at the Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCES

- Agopyan N, Tokutomi N, Akaike N. 1993. Protein kinase A-mediated phosphorylation reduces only the fast desensitizing glycine current in acutely dissociated ventromedial hypothalamic neurons. *Neuroscience* 56:605–615.
- Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. 2002. PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* 5:34–40.
- Albarrán FA, Roa JP, Navarrete R, Castillo R, Nualart F, Aguayo LG. 2001. Effect of protein kinase C activation on the glycine evoked Cl⁻ current in spinal cord neurons. *Brain Res* 902:1–10.
- Alcántara-Hernández R, García-Sáinz A. 2005. Okadaic acid increases the phosphorylation state of α 1A-adrenoceptors and induces receptor desensitization. *Eur J Pharmacol* 525:18–23.
- Beato M, Groot-Kormelink PJ, Colquhoun D, Sivilotti LG. 2004. The activation mechanism of α 1 homomeric glycine receptors. *J Neurosci* 24:895–906.
- Borbe HO, Müller WE, Wollert U. 1981. Specific [³H]strychnine binding associated with glycine receptors in bovine retina. *Brain Res* 205:131–139.
- Brandon NJ, Delmas P, Kittler JT, McDonald BJ, Sieghart W, Brown DA, Smart TG, Moss SJ. 2000. GABAA receptor phosphorylation and functional modulation in cortical neurons by a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 275:38856–38862.
- Chen G, Kittler JT, Moss SJ, Yan Z. 2006. Dopamine D3 receptors regulate GABAA receptor function through a phospho-dependent endocytosis mechanism in nucleus accumbens. *J Neurosci* 26:2513–2521.
- Greferath U, Brandstätter JH, Wässle H, Kirsch J, Kuhse J, Grünert U. 1994. Differential expression of glycine receptor subunits in the retina of the rat: A study using immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *Vis Neurosci* 11:721–729.
- Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B. 2005. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45:727–739.
- Han Y, Slaughter MM. 1998. Protein kinases modulate two glycine currents in salamander retinal ganglion cells. *J Physiol* 508:681–690.
- Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U. 2004. GlyR α 3: An essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304:884–887.
- Heinze L, Harvey RJ, Haverkamp S, Wässle H. 2007. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: Localization of the α 4 subunit. *J Comp Neurol* 500:693–707.

- Inomata H, Nabekura J, Akaike N. 1993. Suppression of taurine response in acutely dissociated substantia nigra neurons by intracellular cyclic AMP. *Brain Res* 2:347–350.
- Kishimoto H, Simon JR, Aprison MH. 1981. Determination of the equilibrium dissociation constants and number of glycine binding sites in several areas of the rat central nervous system. Using a sodium-independent system. *J Neurochem* 37:1015–1024.
- Kittler JT, Moss SJ. 2003. Modulation of GABAA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: Implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr Opin Neurobiol* 13:341–347.
- Kovacs JJ, Hara MR, Davenport CL, Kim J, Lefkowitz RJ. 2009. Arrestin development: Emerging roles for beta-arrestins in developmental signaling pathways. *Dev Cell* 17:443–458.
- Kumar S, Suryanarayanan A, Boyd KN, Comerford CE, Lai MA, Ren Q, Morrow AL. 2010. Ethanol reduces GABAA α 1 subunit receptor surface expression by a protein kinase C γ -dependent mechanism in cultured cerebral cortical neurons. *Mol Pharmacol* 77:793–803.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall UL. 1951. "Protein measurement with the Folin Phenol Reagent". *J Biol Chem* 193:265–275.
- Manzke T, Niebert M, Koch UR, Caley A, Vogelgesang S, Hülsmann S, Ponimaskin E, Müller U, Smart TG, Harvey RJ, Richter DW. 2010. Serotonin receptor 1A-modulated phosphorylation of glycine receptor α 3 controls breathing in mice. *J Clin Invest* 120:4118–4128.
- McKeel DW, Jarett L. 1970. Preparation and characterization of a plasma membrane fraction from isolated fat cells. *J Cell Biol* 44:417–432.
- Nabekura J, Omura T, Akaike N. 1996. Alpha 2 adrenoreceptor potentiates glycine receptor-mediated taurine response through protein kinase A in rat substantia nigra neurons. *J Neurophysiol* 76:2447–2454.
- Pérez-León J, Salceda R. 1995. Different specific binding sites of [³H]glycine and [³H]strychnine in synaptosomal membranes isolated from frog retina. *Neurochem Res* 20:915–922.
- Pippig S, Andexinger S, Daniel K, Puzicha M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lohse MJ. 1993. Overexpression of β -arrestin and β -adrenergic receptor kinase augment desensitization of β ₂-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 268:3201–3208.
- Rickwood D. 1993. Preparative centrifugation: A practical approach. New York: Oxford University Press. p 372.
- Ruiz-Gómez A, García-Calvo M, Vázquez J, Marvizón JC, Valdivieso F, Mayor F Jr. 1989. Thermodynamics of agonist and antagonist interaction with the strychnine-sensitive glycine receptor. *J Neurochem* 52:1775–1780.
- Ruiz-Gómez A, Vaello ML, Valdivieso F, Mayor F Jr. 1991. Phosphorylation of the 48-kDa subunit of the glycine receptor by protein kinase C. *J Biol Chem* 266:559–566.
- Schaeffer JM, Anderson SM. 1981. Identification of strychnine binding sites in the rat retina. *J Neurochem* 36:1597–1600.
- Schönrock B, Bormann J. 1995. Modulation of hippocampal glycine receptor channels by protein kinase C. *Neuroreport* 6:301–304.
- Schmidt E, Schmidt FW. 1983. Methods of enzymatic analysis. Weinheim: Verlag Chemie. p 216–227.
- Segel IH. 1975. Enzyme kinetics. New York: Wiley. p 353–371.
- Song YM, Huang LY. 1990. Modulation of glycine receptor chloride channels by cAMP-dependent protein kinase in spinal trigeminal neurons. *Nature* 348:242–245.
- Swope SL, Moss SJ, Raymond LA, Haganir RL. 1999. Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33:49–78.
- Tang H, Guo DF, Porter JP, Wanaka Y, Inagami T. 1998. Role of cytoplasmic tail of the Type 1A angiotensin II receptor in agonist- and phorbol ester-induced desensitization. *Circ Res* 82:523–531.
- Tapia JC, Espinoza F, Aguayo LG. 1997. Differential intracellular regulation of cortical GABA_A and spinal glycine receptors in cultured neurons. *Brain Res* 769:203–210.
- Terunuma M, Pangalos MN, Moss SJ. 2010. Functional modulation of GABAB receptors by protein kinases and receptor trafficking. *Adv Pharmacol* 58:113–122.
- Vaello ML, Ruiz-Gómez A, Lerma J, Mayor F Jr. 1994. Modulation of inhibitory glycine receptors by phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 269:2002–2008.
- Wässle H, Heinze L, Ivanova E, Majumdar S, Weiss J, Harvey RJ, Haverkamp S. 2009. Glycinergic transmission in the mammalian retina. *Front Mol Neurosci* 2:1–12.
- Wiesner A, Fuhrer C. 2006. Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine kinases in the peripheral and central nervous system: Same players, different roles. *Cell Mol Life Sci* 63:2818–2828.
- Willoughby D, Baillie GS, Lynch MJ, Ciruela A, Houslay MD, Cooper DM. 2007. Dynamic regulation, desensitization, and cross-talk in discrete subcellular microdomains during β ₂-adrenoceptor and prostanoïd receptor cAMP signaling. *J Biol Chem* 282:34235–34249.
- Xu TL, Nabekura J, Akaike N. 1996. Protein kinase C-mediated enhancement of glycine response in rat sacral dorsal commissural neurones by serotonin. *J Physiol* 496:491–501.
- Young AB, Snyder SH. 1973. Strychnine binding associated with glycine receptor of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:2832–2836.
- Zhao WJ, Zhang M, Miao Y, Yang XL, Wang Z. 2010. Melatonin potentiates glycine currents through a PLC/PKC signaling pathway in rat retinal ganglion cells. *J Physiol* 588:2605–2619.

RESULTADOS NO PUBLICADOS

1. Unión específica de [³H]glicina y [³H]estricnina al RGly

El ensayo de unión de ligandos radioactivos nos permite conocer la proporción de receptores localizados en la superficie celular de un tejido, así como detectar cambios de esta proporción en condiciones determinadas. La unión de [³H]glicina y [³H]estricnina alcanzó el equilibrio –saturación de los sitios disponibles en el RGly- a los 30 minutos de incubación y permaneció constante hasta los 90 minutos, por lo que, el tiempo de incubación para determinar la cinética de unión de los radioligandos al RGly fue de 40 minutos. La unión específica de los ligandos radioactivos fue de tipo sigmoide, con K_D s similares (212 nM para [³H]glicina y 50 nM para [³H]estricnina) a las reportadas en la médula espinal. Como se mencionó en el procedimiento experimental, el análisis de los datos se realizó por medio de la ecuación de Hill y del modelo de “Monod-Wyman-Changeux”, ajustando las curvas de saturación a tres ([³H]glicina) y dos sitios posibles de unión ([³H]estricnina). El programa no permitió el ajuste de los datos para un modelo de 1 ó 2 sitios de unión de [³H]glicina. Sin embargo, el análisis manual de los componentes, reveló la presencia de un sitio de alta afinidad con poca capacidad y uno de baja afinidad con capacidad alta (Fig. 5). El análisis de la curva de saturación para [³H]estricnina no se pudo realizar de forma completa, debido a que los sitios de alta afinidad están por debajo del nivel de sensibilidad del método empleado.

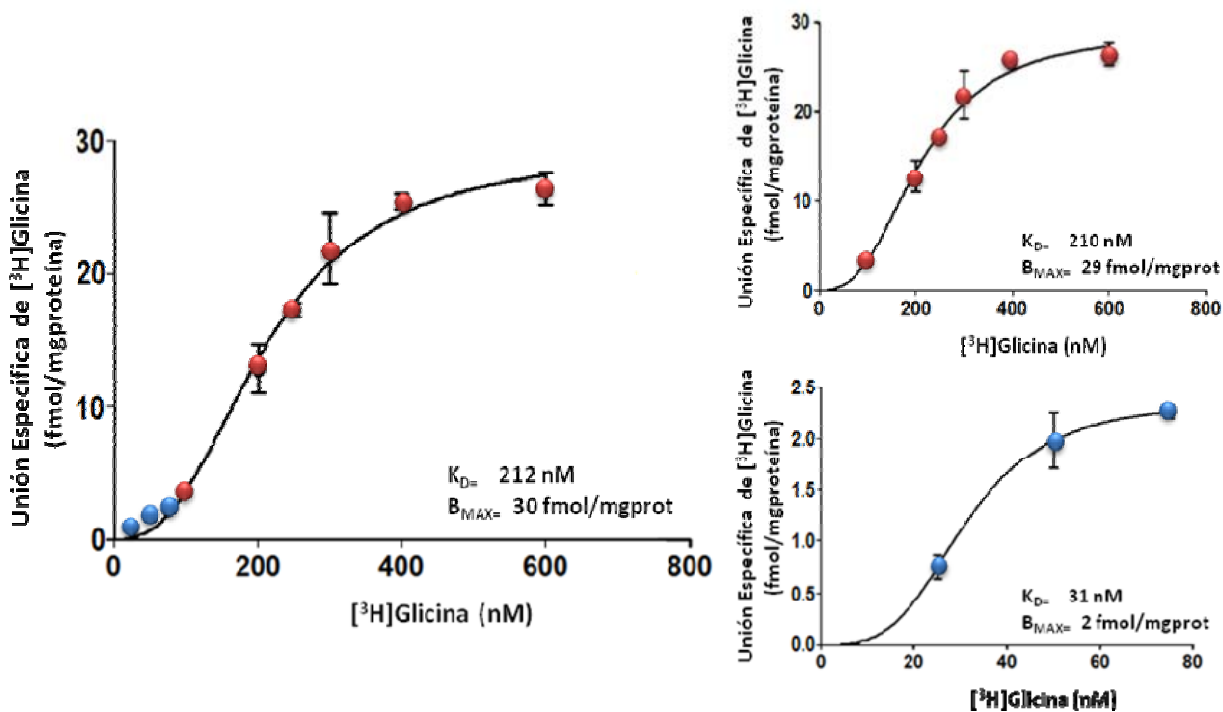


Fig. 5. Unión específica de $[^3\text{H}]$ glicina en la retina de la rata. El análisis de los componentes de la curva de saturación de $[^3\text{H}]$ glicina, reveló la presencia de dos sitios de unión: uno de alta afinidad y baja capacidad (puntos azules) y otro con baja afinidad que tiene alta capacidad (puntos rojos).

2. Fosforilación del RGly por glicina

En nuestras condiciones, la fosforilación basal del RGly incrementó significativamente en respuesta a la activación de la PKA y PKC. Asimismo, la presencia de glicina 1 mM en el medio de incubación, aumentó el estado de fosforilación del receptor en un 28% (Fig. 6), lo cual sugiere que el RGly se regula en respuesta a la unión de su ligando.

3. Posible regulación cruzada del RGly

La activación de receptores acoplados a proteínas G, modifica los niveles de segundos mensajeros que son necesarios para la activación o inhibición de la PKA ó PKC. Hasta el momento, no se ha identificado la existencia de un receptor metabotrópico para glicina, por lo que la regulación del RGly parece ocurrir por medio de la acción de otros neurotransmisores. En este estudio, demostramos que la unión específica de [³H]glicina disminuye en un 34% en presencia del agonista de los receptores muscarínicos carbacol (0.1 mM) (Fig. 7).

Para intentar dilucidar el mecanismo por el que el carbacol disminuye la unión de [³H]glicina al RGly, se determinó el estado de fosforilación del RGly en presencia de diferentes concentraciones de carbacol: 0.1 ó 1 mM (7, 15 minutos). Los resultados muestran que el estado de fosforilación del receptor incrementó ~ 90% con las dos concentraciones de carbacol empleadas (Fig. 8). Asimismo, la fosforilación del RGly aumentó 127% en respuesta a GABA 1mM y 67% a un estímulo luminoso (Fig. 8). En conjunto, nuestros resultados indican que la función del RGly puede estar regulada por la activación de receptores acoplados a

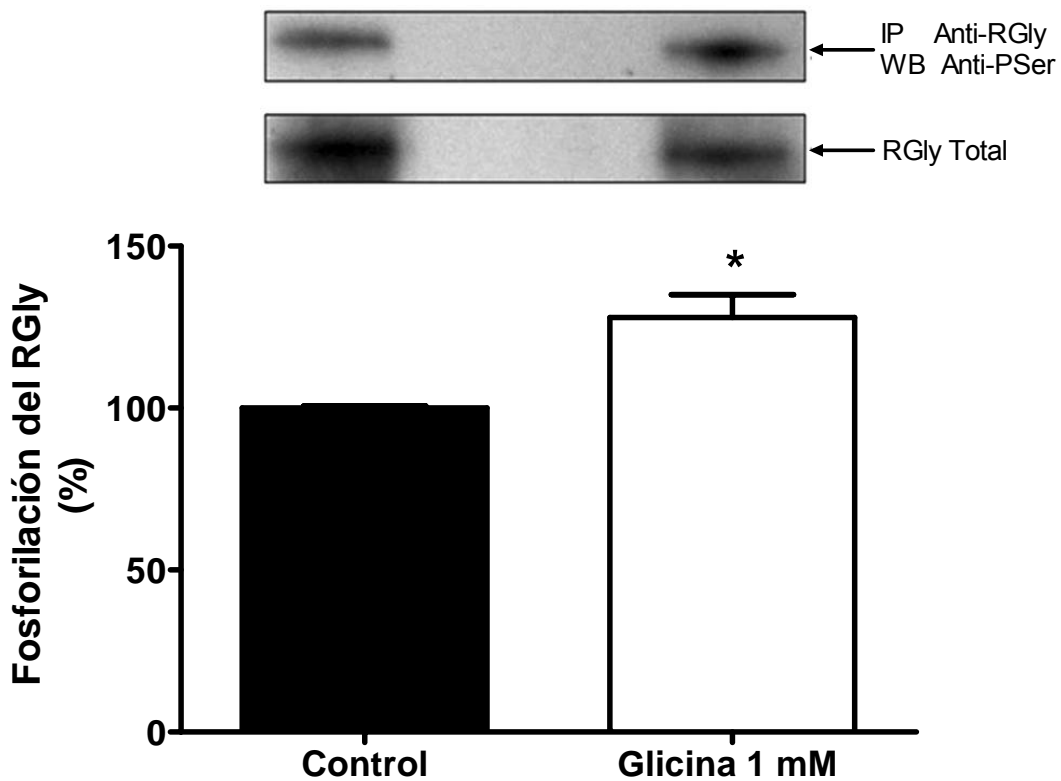


Fig. 6. La glicina incrementa el estado de fosforilación del RGly. El tejido se incubó en Ringer Krebs (40 minutos), en ausencia o presencia de glicina 1mM. La inmunoprecipitación del RGly y el Western blot se realizaron como se detalla en el procedimiento experimental. Los niveles basales de fosforilación del RGly se consideraron como el 100%. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de tres experimentos. *($P < .02$; *t* student vs. control).

proteínas G que participan en circuitos de transmisión colinérgicos, GABAérgicos y/o glutamatérgicos.

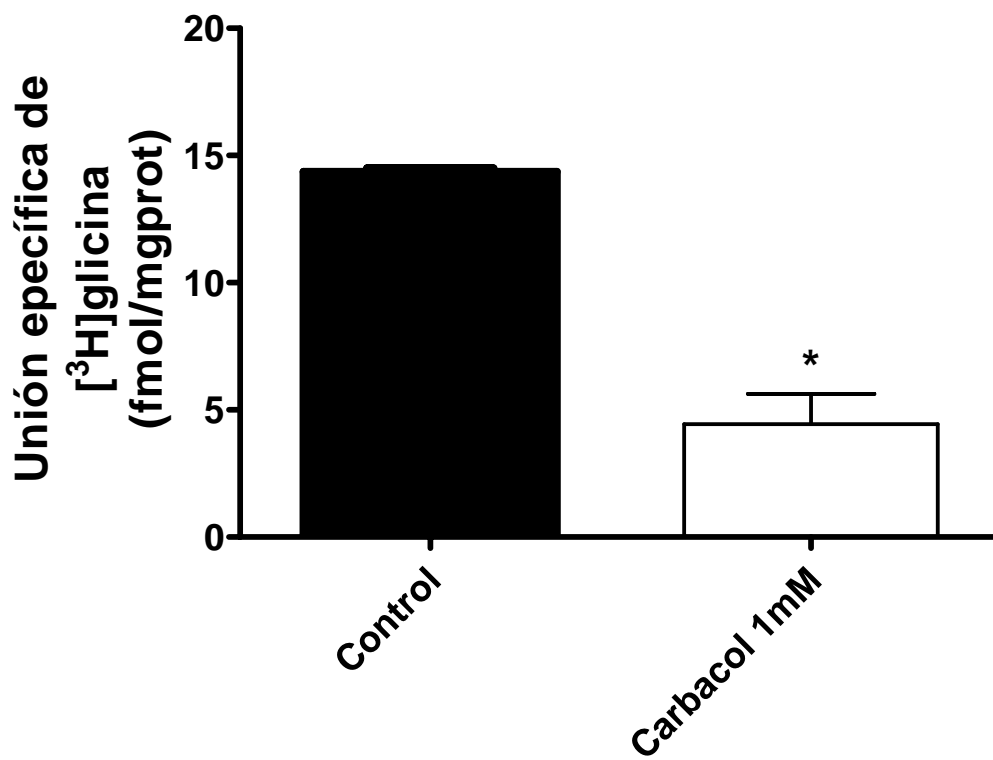


Fig. 7. La unión específica de [3H]glicina 250 nM disminuye en presencia de carbacol 1 mM. La presencia de carbacol 1 mM disminuyó 34% la unión de [3H]glicina al RGLy en la retina. Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes *(P<.004; t student vs. control).

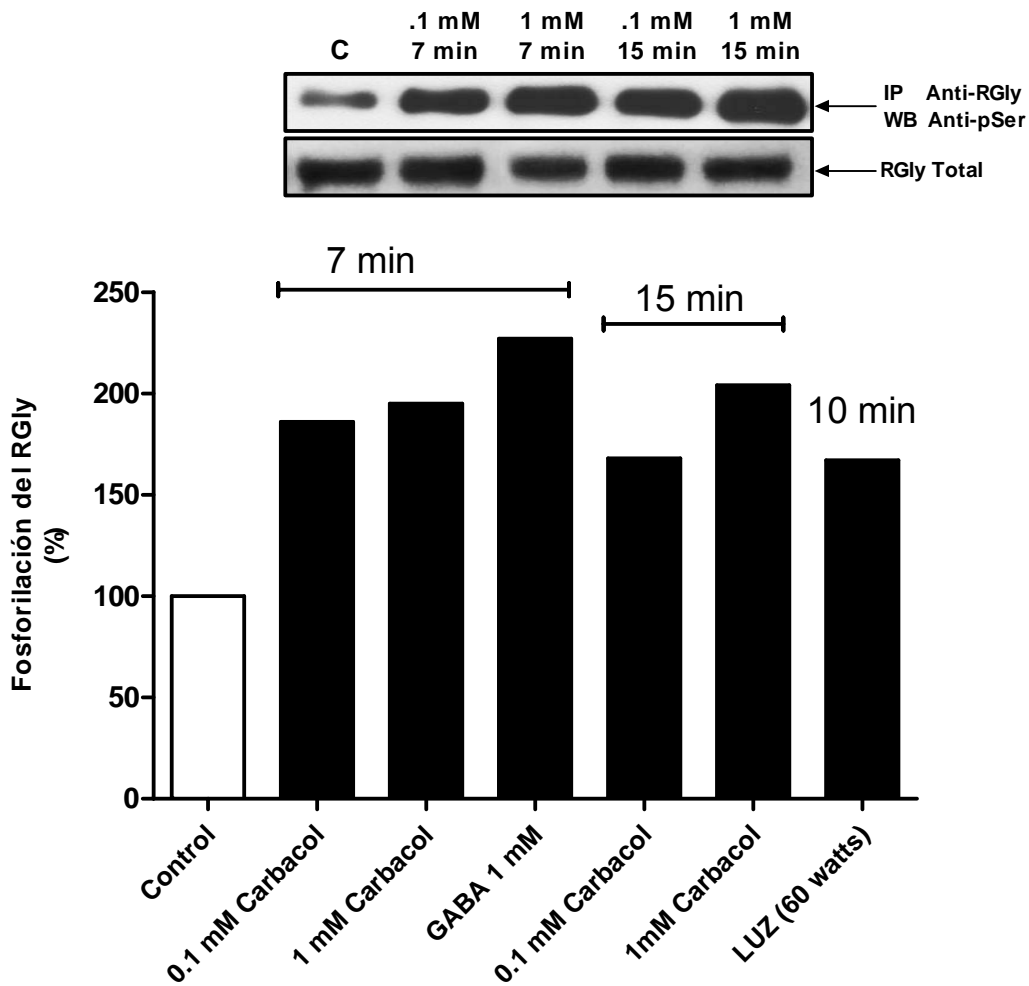


Fig. 8. La fosforilación del RGly incrementa en presencia de carbacol, GABA y de un estímulo luminoso. El tejido se incubó en condiciones de luz roja tenue en presencia de diferentes concentraciones de carbacol ó de GABA 1 mM. Para determinar el efecto de la luz, la retina se aisló en condiciones de oscuridad y la incubación (10 min) se llevó a cabo en condiciones de iluminación normal. Los valores son el promedio de dos datos.

DISCUSIÓN

A pesar de que hace más de 40 años se determinó que la glicina funciona como neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso (Aprison y Werman, 1968), la función y los mecanismos de regulación del receptor post-sináptico que median su acción, el RGly, se han estudiado muy poco. La mayoría de los estudios en los que se ha determinado el efecto que tiene la activación de la PKA o PKC sobre el RGly son de tipo electrofisiológico. Con base en estos trabajos, se sabe que tanto la PKA como la PKC potencian o disminuyen las corrientes producidas por glicina dependiendo de la región del SN, etapa del desarrollo y del sistema de expresión empleado, postulándose que el efecto que tiene la activación de la PKA o PKC sobre el RGly parece depender de diversos factores: i) componentes del citoesqueleto específicos que facilitan la accesibilidad de las cinasas a su sustrato; ii) isoformas de las cinasas presentes en un tejido o sistema de expresión; iii) isoformas de la subunidad α (α_1 - α_4) que constituyen al RGly; iv) actividad de fosfatasas.

Huang y sus colaboradores (2007) demostraron que la activación de la PKC, con el éster de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), induce la internalización de RGly α_1 expresados en la línea celular HEK293. Asimismo, se observó que la internalización del receptor depende de la actividad de la proteína dinamina y de dos leucinas que se localizan en el asa intracelular del receptor que pueden ser el sitio de unión de la proteína adaptina AP2. Sin embargo, el estudio del efecto de las proteínas cinasas sobre un sustrato determinado en líneas celulares no

necesariamente refleja lo que ocurre en el tejido nervioso normal. Por esta razón, nuestros estudios se llevaron a cabo en un sistema completo: la retina de la rata.

El ensayo de unión de ligandos radiactivos nos permite identificar la presencia de proteínas localizadas en la superficie celular y los cambios en la proporción de éstas en ciertas condiciones. Nuestros resultados revelaron que la unión específica de [³H]glicina y [³H]estricnina al RGly presenta una afinidad (K_D) similar a la reportada en la médula espinal (Young and Snyder, 1973; Kishimoto et al. 1981; Ruiz-Gómez et al. 1989) y en membranas totales de la retina (Borbe et al. 1981; Schaeffer and Anderson, 1981; Pérez-León and Salceda, 1995). El análisis de la cinética de unión de los radioligandos demostró la presencia de un sistema cooperativo que se ajusta al modelo de Wyman-Monod-Changeux, así como a la ecuación de Hill. Los coeficientes de Hill (n_H) obtenidos para la unión de [³H]glicina ($n_H = 3$) y [³H]estricnina ($n_H = 2$) denotan un sistema cooperativo con al menos dos sitios de unión que actúan de manera conjunta (Segel, 1975). Estos resultados son consistentes con la respuesta electrofisiológica inducida por glicina, en donde la eficacia máxima de apertura del RGly se obtiene cuando tres sitios de unión son ocupados. Sin embargo, las características de unión obtenidas en este estudio pueden estar relacionadas con la presencia de RGlys formados por diversas subunidades (α_1 - α_4 , β) con diferente afinidad por el ligando.

Una vez establecidas las condiciones de la unión de [³H]glicina y [³H]estricnina al RGly, se probó el efecto que tiene la activación farmacológica de la PKA y PKC sobre la unión específica de los radioligandos en la retina completa de la rata. La activación de la PKA y de la PKC redujo significativamente la unión de ambos

ligandos al RGly, debido a una disminución en la proporción de receptores presentes en la superficie celular (B_{MAX}). De acuerdo con esta interpretación, la Cyt D bloqueó el efecto de las cinasas sobre la unión específica, indicando que el RGly se internaliza en respuesta a la activación de la PKA y PKC. Tanto la activación de la PKA como de la PKC redujo la proporción de RGlys en la membrana plasmática con un incremento en la fracción microsomal únicamente en respuesta a la activación de la PKA. La internalización del RGly en respuesta a la activación de la PKA puede tener dos vertientes: una proporción del RGly puede permanecer en endosomas primarios para su reciclaje hacia la superficie celular o dirigirse hacia el proteosoma o lisosoma para su degradación. Por otra parte, es probable que la activación de la PKC induzca la adición de moléculas de ubiquitina al RGly para controlar su internalización y degradación en la retina. Relacionado con esto, Büttner y sus colaboradores (2001) determinaron que el asa intracelular del RGly $\alpha 1$ contiene en total 10 residuos de lisina, los cuales se ubiquitinan antes de que el receptor se endocite y se degrade en los lisosomas. Sin embargo, estudios posteriores son necesarios para determinar el impacto fisiológico que tiene la activación de la PKC sobre la modulación del RGly en la retina.

La fosforilación de receptores acoplados a proteínas G en sitios específicos es un proceso que regula su función por medio de diferentes mecanismos como es la internalización (Alcántara-Hernández and García-Sáinz, 2005; Terunuma et al., 2010). Asimismo, se ha demostrado que los receptores de tipo “cys-loop”, tales como el RGABA_A, se internalizan en respuesta a la fosforilación por proteínas cinasas (Chen et al. 2006; Kumar et al. 2010). De forma similar, nuestros datos muestran que la internalización del RGly parece depender de mecanismos de

fosforilación/desfosforilación. La activación de la PKA o PKC incrementó el estado de fosforilación basal del RGly desde los 2 minutos de incubación, alcanzando el nivel máximo a los 10-15 min. Aunque la presencia de inhibidores específicos de la PKA (H89) o PKC (BisVII) bloqueó el efecto producido por estas cinasas, la fosforilación basal no se alteró. Estos resultados sugieren que el RGly puede ser regulado por diferentes cinasas de tipo serina/treonina; sin embargo, la participación de PKCs atípicas o nuevas no se puede descartar. Asimismo, la fosforilación basal del RGly incrementó en presencia de 1 mM de glicina, efecto que puede estar asociado con procesos de desensibilización homóloga que en general involucran la internalización de receptores de membrana (Krupnick & Benovic, 1998). Relacionado con esto, la presencia de estriquina (1-10 μ M) indujo la internalización del RGly en cultivos de neuronas de la médula espinal en estado embrionario (Lévi et al., 1998), sugiriendo que el RGly, al igual que los receptores acoplados a proteínas G, se desensibiliza en respuesta a la unión de sus ligandos. De forma fisiológica, la modulación del RGly por proteínas cinasas puede ocurrir por medio de la activación de receptores acoplados a proteínas G que induzcan la activación o inhibición de la PKA o PKC. En efecto, la estimulación luminosa de la retina, previamente adaptada a la oscuridad, incrementó los niveles de fosforilación del RGly. En la retina de los mamíferos, la vía dominada por bastones transduce el estímulo luminoso de los bastones hacia las células bipolares de bastones, las cuales excitan a las células amacrinas glicinérgicas de tipo AII. A su vez, las células AII establecen sinapsis eléctricas con células bipolares de conos ON que, finalmente, contactan sinápticamente con células ganglionares ON. En

paralelo, las células amacrinas glicinérgicas de tipo AII, regulan la actividad de las células bipolares de conos OFF por medio de RGly $\alpha 1$, y en consecuencia, la respuesta de las células ganglionares OFF. En resumen, la transmisión glicinérgica entre las células AII y las células bipolares de conos OFF está involucrada en la vía directa de señalización dominada por bastones, en donde la transferencia rápida de la señal luminosa es esencial, por lo que la fosforilación de RGly $\alpha 1$ expresados en las células bipolares de conos OFF puede ser importante para esta función. La fosforilación de RGly $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$, localizados en diferentes tipos de células amacrinas y ganglionares, puede ser importante para la regulación del sistema ON/OFF, el cual determina la respuestas producidas por las células ganglionares ante un estímulo luminoso (O' Brien et al., 2003). Por otra parte, nuestros resultados sugieren también que la activación de circuitos colinérgicos, mediados por receptores muscarínicos, y GABAérgicos regulan la función del RGly. En la retina del conejo se ha identificado la presencia de un sistema de retroalimentación sináptica que utiliza GABA, acetilcolina y glicina para regular el paso de información de células bipolares dominadas por conos hacia células ganglionares específicas (Zucker y Ehinger, 2001).

CONCLUSIONES

La activación de la PKA y PKC induce la fosforilación del RGly, lo que lleva a su internalización. El incremento en la proporción del RGly en la fracción endosomal por la activación de la PKA, indica que después de su internalización el RGly se puede reciclar a la superficie celular. Por otro lado, la activación de la PKC parece

regular de forma distinta al receptor, debido a que la disminución del RGly en la superficie celular no se asocia con un incremento del receptor en la fracción microsomal, sugiriendo que el receptor se dirige a una vía de degradación.

PERSPECTIVAS

Este es el primer trabajo en el que se demuestra que la activación de la PKA y PKC induce la fosforilación e internalización del RGly en la retina, lo que abre un campo totalmente nuevo en el estudio de este receptor. Actualmente existen diversas técnicas de análisis masivo que nos permitirían identificar los sitios de fosforilación de los subtipos del RGly presentes en la retina, así como las proteínas implicadas en la internalización de este receptor. Asimismo, por medio de microscopía confocal es posible estudiar los mecanismos de reciclamiento y los de degradación del receptor en cultivos celulares de la retina.

LITERATURA CITADA

Agopyan N, Tokutomi N, Akaike N. Protein kinase A-mediated phosphorylation reduces only the fast desensitizing glycine current in acutely dissociated ventromedial hypothalamic neurons. *Neuroscience* **1993** 56(3):605-15.

Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* **2002** 5(1):34-40.

Akabas MH, Karlin A. Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the M1 segment of the alpha-subunit. *Biochemistry* **1995** 34(39):12496-500.

Albarrán FA, Roa JP, Navarrete R, Castillo R, Nualart F, Aguayo LG. Effect of protein kinase C activation on the glycine evoked Cl(-) current in spinal cord neurons. *Brain Res* **2001** 902(1):1-10.

Alcántara-Hernández R, García-Sáinz JA. Okadaic acid increases the phosphorylation state of alpha1A-adrenoceptors and induces receptor desensitization. *Eur J Pharmacol* **2005** 525(1-3):18-23.

Amthor FR, Takahashi ES, Oyster CW. Morphologies of rabbit retinal ganglion cells with complex receptive fields. *J Comp Neurol* (**1989b**) 280:97-121.

Aprison MH, Werman R. The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. *Life Sci* **1965** 4(21):2075-83.

Aprison MH, Werman R. A. A combined neurochemical and neurophysiological approach to identification of central nervous system transmitters. *Neurosci Res* (N Y) **1968** 1(0):143-74.

Arias HR. Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem Biophys Acta* **1998** 1376(2):173-220.

Balkema GW, Pinto LH. Electrophysiology of retinal ganglion cells in the mouse: A study of a normally pigmented mouse and a congenic hypopigmentation mutant, *pearl*. *J Neurophysiol* **1982** 48:968-980.

Becker C-M, Schmieden V, Tarroni P, Strasser U, Betz H. Isoform-selective deficit of glycine receptors in the mouse mutant spastic. *Neuron* **1992** 8:283-289.

Betz H, Schmitt B, Becker CM, Grenningloh G, Rienitz A. The vertebrate glycine receptor protein. *Biochem Soc Symp* **1986** 52:57-63.

Betz H, Becker CM. The mammalian glycine receptor: biology and structure of a neuronal chloride channel protein. *Neurochem Int* **1988** 13(2):137-46.

Betz H, Laube B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem* **2006** 97:1600-1610.

Blanton MP, Cohen JB. Identifying the lipid-protein interface of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications. *Biochemistry* **1994** 33(10):2859-72.

Borbe HO, Müller WE, Wollert U. Specific [3H]strychnine binding associated with glycine receptors in bovine retina. *Brain Res* **1981** 205(1):131-9.

Bormann J, Rundström N, Betz H, Langosch D. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J* **1993** 12(10):3729-37.

Büttner C, Sadtler S, Leyendecker A, Laube B, Griffon N, Betz H, Schmalzing G. Ubiquitination precedes internalization and proteolytic cleavage of plasma membrane-bound glycine receptors. *J Biol Chem* **2001** 276(46):42978-85.

Caldwell JH, Daw NW, Wyatt HJ. Effects of picrotoxin and strychnine on rabbit retinal ganglion cells: Lateral interactions for cells with more complex receptive fields. *J Physiol* **1978** 276;277-298.

Caraiscos VB, Mihic SJ, MacDonald JF, Orser BA. Tyrosine kinases enhance the function of glycine receptors in rat hippocampal neurons and human alpha(1)beta glycine receptors. *J Physiol* **2002** 539(Pt 2):495-502.

Cascio M, Shenkel S, Grodzicki RL, Sigworth FJ, Fox RO. Functional reconstitution and characterization of recombinant human alpha 1-glycine receptors. *J Biol Chem* **2001** 276(24):20981-8.

Chen G, Kittler JT, Moss SJ, Yan Z. Dopamine D3 receptors regulate GABA_A receptor function through a phospho-dependent endocytosis mechanism in nucleus accumbens. *J Neurosci* **2006** 26:2513–2521.

Curtis DR, Hösli L, Johnston GA, Johnston IH. The hyperpolarization of spinal motoneurons by glycine and related amino acids. *Exp Brain Res* **1968** 5(3):235-58.

Curtis DR, Hösli L, Johnston GA. A pharmacological study of the depression of spinal neurones by glycine and related amino acids. *Exp Brain Res* **1968** 6(1):1-18.

Dacheux RF, Raviola E. The rod pathway in the rabbit retina: A depolarizing bipolar and amacrine cell *J Neurosci* **1986** 6:331-345.

De Saint Jan D, David-Watine B, Korn H, Bregestovski P. Activation of human alpha1 and alpha2 homomeric glycine receptors by taurine and GABA. *J Physiol* **2001** 535(Pt 3):741-55.

Engblom AC, Carlson BX, Olsen RW, Schousboe A, Kristiansen U. Point mutation in the first transmembrane region of the beta 2 subunit of the gamma--aminobutyric acid type A receptor alters desensitization kinetics of gamma--aminobutyric acid- and anesthetic-induced channel gating. *J Biol Chem* **2002** 277(20):17438-47.

Famiglietti EV, Kolb H. A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res* **1975** 84, 293–300.

Gisselmann G, Galler A, Friedrich F, Hatt H, Bormann J. Cloning and functional characterization of two glycine receptor alpha-subunits from the perch retina. *Eur J Neurosci* **2002** 16(1):69-80.

Graham LT Jr, Shank RP, Werman R, Aprison MH. Distribution of some synaptic transmitter suspects in cat spinal cord: glutamic acid, aspartic acid, gamma-aminobutyric acid, glycine and glutamine. *J Neurochem* **1967** 14(4):465-72.

Greferath U, Brandstätter JH, Wässle H, Kirsch J, Kuhse J, Grünert U. Differential expression of glycine receptor subunits in the retina of the rat: a study using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Vis Neurosci* **1994** 11(4):721-9.

Grenningloh G, Pribilla I, Prior P, Multhaup G, Beyreuther K, Taleb O, Betz H. Cloning and expression of the 58 kd beta subunit of the inhibitory glycine receptor. *Neuron* **1990** 4(6):963-70.

Grudzinska J, Schemm R, Haeger S, Nicke A, Schmalzing G, Betz H, Laube B. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* **2005** 45(5):727-39.

Grünert U, Wässle H. Immunocytochemical localization of glycine receptors in the mammalian retina. *J Comp Neurol* **1993** 335(4):523-37.

Grünert U, Ghosh KK. Midget and parasol ganglion cells of the primate retina express the alpha1 subunit of the glycine receptor. *Vis Neurosci* **1999** 16(5):957-66.

Han Y, Slaughter MM. Protein kinases modulate two glycine currents in salamander retinal ganglion cells. *J Physiol* **1998** 508 (Pt 3):681-90.

Hartline HK. The response of single optic nerve fibers of the vertebrate eye to illumination of the retina. *Am J Physiol* **1938** 121:400-415.

Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, et al. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* **2004** 304(5672):884-7.

Haverkamp S, Müller U, Harvey K, Harvey RJ, Betz H, Wässle H. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha 3 subunit. *J Comp Neurol* **2003** 465(4):524-39.

Haverkamp S, Müller U, Zeilhofer HU, Harvey RJ, Wässle H. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha2 subunit. *J Comp Neurol* 2004 477(4):399-411.

Heinze L, Harvey RJ, Haverkamp S, Wässle H. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha4 subunit. *J Comp Neurol* **2007** 500(4):693-707.

Hsueh HA, Molnar A, Werblin FS. Amacrine-to-amacrine cell inhibition in the rabbit retina. *J Neurophysiol* **2008** 100(4):2077-88.

Huang R, He S, Chen Z, Dillon GH, Leidenheimer NJ. Mechanisms of homomeric alpha1 glycine receptor endocytosis. *Biochemistry* **2007** 46(41):11484-93.

Ikeda H, Sheardown MJ. Transmitters mediating inhibition of ganglion cells in the cat retina: iontophoretic studies in vivo. *Neuroscience* **1983** 8:837-853.

Inomata H, Nabekura J, Akaike N. Suppression of taurine response in acutely dissociated substantia nigra neurons by intracellular cyclic AMP. *Brain Res* **1993** 615(2):347-50.

Ivanova E, Müller U, Wässle H. Characterization of the glycinergic input to bipolar cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci* **2006** 23:350-64.

Jäger J, Wässle H. Localization of glycine uptake and receptors in the cat retina. *Neurosci Lett* **1987** 75:147-151.

Jenkins A, Andreasen A, Trudell JR, Harrison NL. Tryptophan scanning mutagenesis in TM4 of the GABA(A) receptor alpha1 subunit: implications for modulation by inhaled anesthetics and ion channel structure. *Neuropharmacology* **2002** 43(4):669-78.

Johnston GA. The intraspinal distribution of some depressant amino acids. *J Neurochem* **1968** 15(9):1013-7.

Johnston GA, Iversen LL. Glycine uptake in rat central nervous system slices and homogenates: evidence for different uptake systems in spinal cord and cerebral cortex. *J Neurochem* **1971** 18(10):1951-61.

Jusuf PR, Haverkamp S, Grünert U. Localization of glycine receptor alpha subunits on bipolar and amacrine cells in primate retina. *J Comp Neurol* **2005** 488(2):113-28.

Kelley SP, Dunlop JI, Kirkness EF, Lambert JJ, Peters JA. A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature* **2003** 424(6946):321-4.

Kolb H, Famiglietti EV. Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of the cat retina. *Science* **1974** 186, 47–49.

Kolb H, West RW. Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. *J Neurocytol* 1977 6(2):155-70.

Kolb H y Nelson R. Rod pathways in the retina of the cat. *Vision Res* 1983 23:301-312.

Kuffler SK. Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J. Neurophysiol* 1953 16, 37-68.

Kuhse J, Schmieden V, Betz H. Identification and functional expression of a novel ligand binding subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* **1990** 265(36):22317-20.

Kumar S, Suryanarayanan A, Boyd KN, Comerford CE, Lai MA, Ren Q, Morrow AL. Ethanol reduces GABAA alpha1 subunit receptor surface expression by a protein kinase C gamma-dependent mechanism in cultured cerebral cortical neurons. *Mol Pharmacol* **2010** 77(5):793-803.

Langosch D, Thomas L, Betz H. Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci USA* **1988** 85(19):7394-8.

Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* **1997** 18(3):493-503.

Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci* **2002** 23(11):519-27.

Lee SC, Zhong YM, Yang XL. Expression of glycine receptor and transporter on bullfrog retinal Müller cells. *Neurosci Lett* **2005** 387(2):75-9.

Lévi S, Vannier C, Triller A. Strychnine-sensitive stabilization of postsynaptic glycine receptor clusters. *J Cell Sci* **1998** 111:335-45.

Lin B, Martin PR, Solomon SG, Grünert U. Distribution of glycine receptor subunits on primate retinal ganglion cells: a quantitative analysis. *Eur J Neurosci* **2000** 12(12):4155-70.

Lin B, Masland RH. Populations of wide-field amacrine cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* **2006** 499(5):797-809.

Logan WJ, Snyder SH. High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. *Brain Res* **1972** 42(2):413-31.

Lynch JW, Rajendra S, Pierce KD, Handford CA, Barry PH, Schofield PR. Identification of intracellular and extracellular domains mediating signal transduction in the inhibitory glycine receptor chloride channel. *EMBO J* **1997** 16(1):110-20.

Majumdar S, Weiss J, Wässle H. Glycinergic input of widefield, displaced amacrine cells of the mouse retina. *J Physiol* **2009** 587:3831-49.

Maksay G, Bíró T. Dual cooperative allosteric modulation of binding to ionotropic glycine receptors. *Neuropharmacology* **2002** 43(7):1087-98.

Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, Betz H. Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* **1991** 266(4):2048-53.

Mangin JM, Baloul M, Prado De Carvalho L, Rogister B, Rigo JM, Legendre P. Kinetic properties of the alpha2 homo-oligomeric glycine receptor impairs a proper synaptic functioning. *J Physiol* **2003** 553(Pt 2):369-86.

Manzke T, Niebert M, Koch UR, Caley A, Vogelgesang S, Hülsmann S, Ponimaskin E, Müller U, Smart TG, Harvey RJ, Richter DW. Serotonin receptor 1A-modulated phosphorylation of glycine receptor α 3 controls breathing in mice. *J Clin Invest* **2010** 120(11):4118-28.

Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nat. Neurosci* 2001 4:877–886.

Miller PS, Harvey RJ, Smart TG. Differential agonist sensitivity of glycine receptor alpha2 subunit splice variants. *Br J Pharmacol* 2004 143(1):19-26.

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* **1999** 288(4):765-86.

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **2003** 423(6943):949-55.

Mohammadi B, Krampfl K, Cetinkaya C, Moschref H, Grosskreutz J, Dengler R, Bufler J. Kinetic analysis of recombinant mammalian alpha(1) and alpha(1)beta glycine receptor channels. *Eur Biophys J* **2003** 32(6):529-36.

Müller F, Wässle H, Voigt T. Pharmacological modulation of the rod pathway in the cat retina. *J Neurophysiol* **1988** 59:1657-1672.

Nelson R, Famiglietti EV, Kolb H. Intracellular staining reveals different levels of stratification for On-and Off-centre ganglion cells in cat retina. *J Neurophysiol* **1978** 41:472-483.

O'Brien BI, Richardson RC, Berson DM. Inhibitory network properties shaping the light evoked responses of cat alpha retinal ganglion cells. *Vis Neurosci* **2003** 20:351–361.

Pérez-León JA, Salceda R. Different specific binding sites of [3H]glycine and [3H]strychnine in synaptosomal membranes isolated from frog retina. *Neurochem Res* 1995 20(8):915-22.

Pfeiffer F, Graham D, Betz H. Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* **1982** 257(16):9389-93.

Pfeiffer F, Simler R, Grenningloh G, Betz H. Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* **1984** 81(22):7224-7.

Pinto LH, Grünert U, Studholme K, Yazulla S, Kirsch J, Becker CM. Glycine receptors in the retinas of normal and *spastic* Mutant Mice. Invest Ophthalmol Vis Sci **1994** 35:3633-3639.

Pourcho RG, Goebel DJ. A combined Golgi and autoradiographic study of [3H]-glycine-accumulating amacrine cells in the retina. J Comp Neurol 1985 233:473-480.

Pourcho RG, Goebel DJ. Visualization of endogenous glycine in cat retina: An immunocytochemical study with Fab fragments. J Neurosci **1987** 7:1189-1197.

Pourcho RG, Owczarzak MT. Connectivity of glycine immunoreactive amacrine cells in the cat retina. J Comp Neurol **1991a** 307(4):549-61.

Pourcho RG, Owczarzak MT. Glycine receptor immunoreactivity is localized at amacrine synapses in cat retina. Vis Neurosci **1991b** 7(6):611-8.

Pourcho RG. Neurotransmitters in the retina. Curr Eye Res **1996** 15(7):797-803.

Pribilla I, Takagi T, Langosch D, Bormann J, Betz H. The atypical M2 segment of the beta subunit confers picrotoxinin resistance to inhibitory glycine receptor channels. EMBO J **1992** 11(12):4305-11.

Roberts PJ, Mitchell JF. The release of amino acids from the hemisectioned spinal cord during stimulation. J Neurochem **1972** 19(11):2473-81.

Ruiz-Gómez A, Vaello ML, Valdivieso F, Mayor F Jr. Phosphorylation of the 48-kDa subunit of the glycine receptor by protein kinase C. *J Biol Chem* **1991** 266(1):559-66.

Saito H. The effects of strychnine and bicuculline on the responses of X- and Y-cells of the isolated eye-cup preparation of the cat *Brain Res* 1981 212:243-248.

Saito H. Pharmacological and morphological differences between X- and Y-type ganglion cells in the cat's retina *Vision Res* 1983 23:1299-1308.

Salceda R, Aguirre-Ramírez M. Characterization of strychnine-sensitive glycine receptor in the intact frog retina: modulation by protein kinases. *Neurochem Res* **2005** 30(3):411-6.

Sassoè-Pognetto M, Wässle H, Grünert U. Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: cone bipolar cells express the alpha 1 subunit of the glycine receptor. *J Neurosci* **1994** 14(8):5131-46.

Sassoè-Pognetto M, Wässle H. Synaptogenesis in the rat retina: subcellular localization of glycine receptors, GABA(A) receptors, and the anchoring protein gephyrin. *J Comp Neurol* **1997** 381(2):158-74.

Schaeffer JM, Anderson SM. Identification of strychnine binding sites in the rat retina. *J Neurochem* **1981** 36(4):1597-600.

Schmieden V, Kuhse J, Betz H. Mutation of glycine receptor subunit creates beta-alanine receptor responsive to GABA. *Science* **1993** 262(5131):256-8.

Schönrock B, Bormann J. Modulation of hippocampal glycine receptor channels by protein kinase C. *Neuroreport* **1995** 6(2):301-4.

Song YM, Huang LY. Modulation of glycine receptor chloride channels by cAMP-dependent protein kinase in spinal trigeminal neurons. *Nature* **1990** 348(6298):242-5.

Stone MC, Pinto LH. Receptive field organization of retinal ganglion cells in the retina of the spastic mutant mouse. *J Physiol* **1992** 456:125-142.

Stone MC, Pinto LH. Response properties of ganglion cells in the isolated mouse retina. *Vis Neurosci* **1993** 10:31-39.

Tapia JC, Espinoza F, Aguayo LG. Differential intracellular regulation of cortical GABA(A) and spinal glycine receptors in cultured neurons. *Brain Res* **1997** 769(2):203-10.

Terunuma M, Pangalos MN, Moss SJ. Functional modulation of GABAB receptors by Protein kinases and receptor trafficking. *Adv Pharmacol* **2010** 58:113-22.

Uchiyama M, Hirai K, Hishinuma F, Akagi H. Down-regulation of glycine receptor channels by protein kinase C in *Xenopus* oocytes injected with synthetic RNA. *Brain Res Mol Brain Res* **1994** 24(1-4):295-300.

Vaello ML, Ruiz-Gómez A, Lerma J, Mayor F Jr. Modulation of inhibitory glycine receptors by phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **1994** 269(3):2002-8.

Vandenberg RJ, Handford CA, Schofield PR. Distinct agonist- and antagonist-binding sites on the glycine receptor. *Neuron* **1992** 9(3):491-6.

Wässle H. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* **2004** 5:747–757.

Werman R, Davidoff RA, Aprison MH. Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine. *Nature* **1967** 214(5089):681-3.

Werman R, Davidoff RA, Aprison MH. Inhibitory of glycine on spinal neurons in the cat. *J Neurophysiol* **1968** 31(1):81-95.

Weiss J, O'Sullivan GA, Heinze L, Chen H-X, Betz H, Wässle H. Glycinergic input of small-field amacrine cells in the retinas of wildtype and glycine receptor deficient mice. *Mol Cell Neurosci* **2008** 37:40-45.

Williams DB, Akabas MH. Evidence for distinct conformations of the two alpha 1 subunits in diazepam-bound GABA(A) receptors. *Neuropharmacology* **2001** 41(5):539-45.

Young AB, Snyder SH. Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973 70(10): 2832-6.

Young AB, Snyder SH. The glycine synaptic receptor: evidence that strychnine binding is associated with the ionic conductance mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974 71(10):4002-5.

Zhang H, Karlin A. Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the M1 segment of the beta-subunit. *Biochemistry* **1997** 36(50):15856-64.

Zucker CL, Ehinger B. Complexities of retinal circuitry revealed by neurotransmitter receptor localization. *Prog Brain Res* **2001** 131:71-81.