



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

**Identificación del promotor transcripcional para la expresión
del receptor GABA_C ρ 1 en neuronas bipolares de retina**

Tesis que para optar por el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta

ARTURO ISRAEL MACHUCA PARRA

Director de tesis:

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Entidad académica, Instituto de Neurobiología

Campus Juriquilla, Querétaro, 2013



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.

Índice general

Lista de figuras.....	3
Lista de tablas.....	5
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Abreviaciones.....	8
Introducción.....	11
Antecedentes.....	15
Expresión de los receptores GABA _A	
Promotores de los genes GABA _A	
Subunidades α	
Subunidades β	
Subunidades γ	
Subunidades δ, ϵ, θ y π	
Subunidades ρ	
Importancia.....	26
Hipótesis.....	27
Objetivos.....	27
Objetivo general	
Objetivos específicos	
Estrategia General.....	28
Materiales y Métodos.....	29
Animales y disección de retinas	
Extracción de ARN y qRT-PCR	
Ensayo 5'-RACE	
Construcciones plasmídicas	
Transformación de los ADNs plasmídicos	
Obtención de los ADNs plasmídicos mediante minipreparación	
Purificación de los ADNs recombinantes usando columnas de QIAGEN	
Cultivos celulares, transfecciones y ensayos de los genes reporteros	
Electroporación	
Inmunofluorescencias	
Análisis estadístico de los datos	
Resultados.....	40
Análisis <i>in silico</i> e identificación de los sitios de inicio de la transcripción del gen GABA ρ 1	
Identificación de la región mínima promotora del gen GABA ρ 1 en células STC-1	
Los elementos <i>cis</i> -reguladores requeridos para la actividad del promotor de 0.232-kb en células STC-1	
La electroporación <i>in vitro</i> no modifica los niveles endógenos de expresión del ARNm del gen GABA ρ 1 en explantes de retina	
Actividad del promotor GABA ρ 1 en retina	
Discusión.....	62
Conclusiones.....	72
Bibliografía.....	73
Anexo.....	89

Lista de figuras

Figura	Página
1. Receptores activados por GABA.....	12
2. Modelo estructural propuesto para los receptores GABA ρ	13
3. Expresión del receptor GABA ρ 1 en el Sistema Nervioso Central.....	17
4. Esquema de la modulación de la liberación de glutamato por parte de las neuronas bipolares en retina.....	18
5. Expresión de las subunidades GABA ρ 1 y GABA ρ 2 de ratón.....	20
6. Análisis <i>in silico</i> e identificación de los sitios de inicio de la transcripción para el gen GABA ρ 1.....	41
7. Alineamiento de las secuencias que se ubican 5' de la región codificante del gen GABA ρ 1.....	42
8. Alineamiento de los posibles promotores del gen GABA ρ 1 en distintos vertebrados...	44
9. Expresión de la subunidad ρ 1 en células STC-1.....	45
10. Deleciones seriales de la región 5' del gen GABA ρ 1.....	46
11. Identificación de la mínima región promotora del gen GABA ρ 1 de ratón en células STC-1.....	47
12. Identificación de la mínima región promotora del gen GABA ρ 1 de ratón en células GT1-7.....	48
13. Identificación de la mínima región promotora del gen GABA ρ 1 de ratón en células 3T3.....	49
14. Identificación de la mínima región promotora del gen GABA ρ 1 de ratón en la línea celular HEK293.....	49
15. Deleciones de los elementos <i>cis</i> -reguladores necesarios para la actividad del promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb.....	50
16. Determinación de los elementos <i>cis</i> -reguladores críticos para la actividad del promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb en células STC-1.....	51
17. Mutaciones de los elementos <i>cis</i> -reguladores necesarios para la actividad del promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb.....	52

18. Actividad del promotor GABAρ1 de 0.232-kb incluyendo las mutaciones de los posibles sitios de unión a factores de transcripción.....	53
19. La electroporación <i>in vitro</i> no modifica los niveles de expresión endógena del ARNm del gen GABAρ1 en explantes de retina.....	54
20. Deleciones seriales de la región 5' del gen GABAρ1.....	55
21. Identificación de la región promotora del gen GABAρ1 en retina de ratón.....	56
22. Elementos <i>cis</i>-reguladores requeridos para la actividad del promotor GABAρ1 en retina.....	57
23. Actividad del promotor GABAρ1 de 0.232-kb incluyendo las mutaciones de los posibles sitios de unión a factores de transcripción en retina.....	58
24. El promotor GABAρ1 de 0.232-kb active transcripción en la capa nuclear interna de la retina.....	59
25. El promotor GABAρ1 de 0.232-kb activa transcripción en las neuronas bipolares de retina tipo ON y en la glía de Müller.....	60
26. El promotor GABAρ1 no activa transcripción en cerebelo.....	61

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Propiedades estructurales, farmacológicas y funcionales de los receptores ionotrópicos GABA_A y GABA_ρ.....	14
2. Secuencias de oligonucleótidos usados en la qRT-PCR para amplificar los genes RplP0, actina y GABA_ρ1.....	30
3. Secuencias de oligonucleótidos usados en el ensayo 5'-RACE para amplificar el UTR-5' del gen GABA_ρ1.....	31
4. Secuencias de oligonucleótidos usados para la generación de las clonas con las diferentes versiones del promotor GABA_ρ1 dirigiendo de manera independiente la expresión de los genes reporteros β-gal y luciferasa.....	33

Resumen

Los receptores GABA ρ generan corrientes iónicas rápidas en la sinapsis de la terminal axónica de las neuronas bipolar tipo ON de la retina, actuando como punto de control de la neurotransmisión a lo largo de la vía visual. En el ratón “knock out” para la subunidad GABA ρ 1, la inhibición GABAérgica en las neuronas bipolares es totalmente eliminada, demostrando así su papel fundamental en la retina. El ARNm del gen GABA ρ 1 es expresado en la retina de ratón después del día 7 postnatal y poco se sabe acerca de su regulación transcripcional.

Para identificar el promotor del gen GABA ρ 1 se llevaron a cabo análisis *in silico* y estos indicaron que un fragmento de 0.290-kb, el cual flanquea el extremo 5' del gen, incluye posibles sitios de unión a varios factores de transcripción, entre ellos AP1, AP2, Ik-2, SP1, SRY y E2F-myc, dos elementos Inr y carece de caja TATA. Con el ensayo de RACE-5' se lograron definir tres sitios de inicio de la transcripción (TSS) agrupados en el primer exón. Ensayos con el gen reportero luciferasa indicaron que un fragmento de 0.232-kb ubicado río arriba del ATG es el promotor mínimo, activando la transcripción de un gen reportero en líneas celulares transfectadas y en retinas electroporadas *in vitro*. El segundo Inr y el sitio AP1 son importantes para activar transcripción en células STC-1 transfectadas y en explantes de retina electroporados *in vitro*. Finalmente, el fragmento de 0.232-kb dirige la expresión de GFP en la capa nuclear interna de la retina, en donde las neuronas bipolares están presentes.

Este trabajo abre camino a futuros estudios de los elementos moleculares que controlan la transcripción de GABA ρ 1 y que regulan su expresión durante el desarrollo de la retina.

Abstract

GABA ρ receptors generate rapid synaptic ion currents at the axon end of retinal ON bipolar neurons, acting as a point of control along the visual pathway. In the GABA ρ 1 subunit knock out mouse, GABAergic inhibition in the bipolar cells is eliminated, showing its role. GABA ρ 1 mRNA is expressed in mouse retina after postnatal day 7, but little is known about its transcriptional regulation.

To identify the GABA ρ 1 promoter, *in silico* analyses were performed and indicated that a 0.290-kb fragment, flanking the 5'-end of the GABA ρ 1 gene, includes putative transcription factor binding sites such as AP1, AP2, Ik-2, SP1, SRY, and E2F-myc, two Inr elements, and it lacks a TATA-box. A RACE assay showed three transcription start sites (TSS) clustered in the first exon. Luciferase reporter assays indicated that a 0.232-kb fragment upstream from the ATG is the minimal promoter, activating transcription in transfected cell lines and *in vitro* electroporated retinae. The second Inr (Inr-B) and AP1 site are important to activate transcription in transfected STC-1 cells and *in vitro* electroporated retinal explants. Finally, the 0.232-kb fragment drives GFP expression to the inner nuclear layer, where bipolar cells are present.

This first work paves the way for further studies of molecular elements that control GABA ρ 1 transcription and regulate its expression during retinal development.

Abreviaciones

°C: grados Celsius

Act: actina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AP1: proteína activadora 1

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CACA: ácido-4-cis-amino-crotónico

DAPI: 4', 6-Diamidino-2-fenilindol

DEPC: dietilpirocarbonato

FT: factor de transcripción

g: gramo

GABA: ácido γ -aminobutírico

GABA_A-Rs: receptores GABA_A

GFP: proteína verde fluorescente

GCL: capa de células ganglionares

GS: glutamino sintetasa

GT1-7: neuronas liberadoras de la hormona gonadotropina

HEK293: células humanas embrionarias de riñón

Ik-2: Ikarus

INL: capa nuclear interna

Inr: iniciador

kb: kilopares de bases

L7: proteína L7 específica de células de Purkinje

M: Molaridad

mg: miligramos

ml: mililitro

mM: milimolar

μg: microgramo

μl: microlitro

mGluR6: receptor metabotrópico de glutamato tipo 6 de ratón

N: Normalidad

ng: nanogramo

nm: nanómetro

ONL: capa nuclear externa

pb: pares de bases

PBS: buffer salino de fosfatos

Pcp-2: proteína 2 de la célula de Purkinje

pH: logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno

PKC α : protein cinasa C alfa

®: marca registrada

RACE: amplificación rápida de los extremos de ADNc

RplP0: proteína ribosomal, grande, P0

rpm: revoluciones por minuto

SN: sistema nervioso

SNC: sistema nervioso central

SP1: proteína específica 1

SRY: gen SRY

STC-1: célula secretora de tumor

TPMPA: ácido 1, 2, 5, 6-tetrahidropiridina-4-metilfosfónico

TSS: sitio de inicio de la transcripción

U: unidades

V: voltios

Introducción

Las células del Sistema Nervioso (SN) están especializadas anatómicamente y funcionalmente para la transmisión de señales químicas mediante la liberación de sustancias denominadas neurotransmisores. Estos son liberados en respuesta a potenciales de acción en las células presinápticas para influir en la actividad de células postsinápticas vecinas y producir efectos excitatorios o inhibitorios sobre estas. Dichos efectos dependen de la identidad de los neurotransmisores liberados y de los receptores presentes (Zigmond *et al.*, 1999). Ejemplos de neurotransmisores excitatorios son la acetilcolina y el glutamato, y dentro de los inhibitorios la glicina y el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Martin y Olsen, 2000).

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio más abundante en la retina y en el cerebro de vertebrados (Martin y Olsen, 2000). Su función en el cerebro adulto es inhibir el potencial sináptico excitatorio de las neuronas, es decir, hiperpolarizando la célula y haciendo así más difícil el inicio de un potencial de acción. Sin embargo, en etapas tempranas del desarrollo el GABA presenta un efecto como neurotransmisor excitatorio, debido a una diferencia en la concentración intracelular de iones cloruro (Zigmond *et al.*, 1999).

La síntesis del GABA la lleva a cabo la enzima glutamato descarboxilasa, la cual remueve el grupo α -carboxilo del glutamato liberando CO_2 y produciendo el GABA. Esta enzima presenta dos isoformas (GAD65 ubicada en las membranas y en terminales nerviosas, mientras que GAD67 ampliamente distribuida en la célula) codificadas por dos genes distintos. (Soghomonian y Martin, 1998).

El GABA puede activar dos tipos de receptores: los receptores ionotrópicos GABA_A y los receptores metabotrópicos GABA_B (Olsen y Seighart, 2008). Estos dos receptores difieren

en la composición de subunidades y en sus propiedades de activación, además de sus perfiles moleculares, farmacológicos, estructurales y fisiológicos (Figura 1).

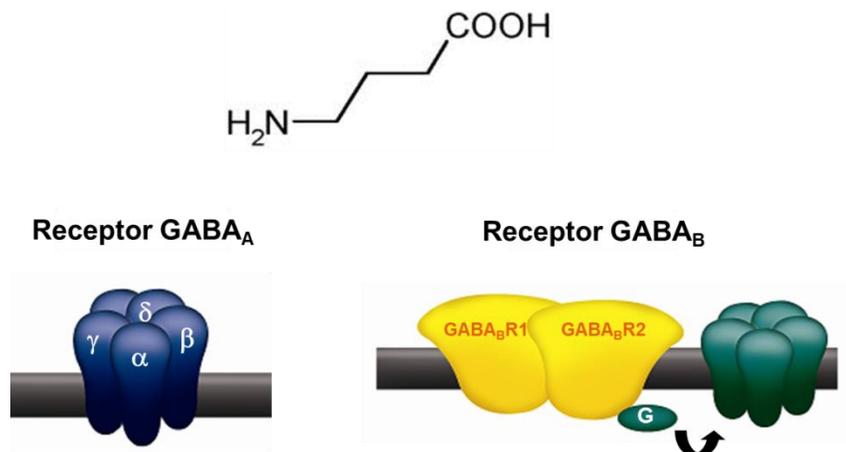


Figura 1. Receptores activados por GABA. El neurotransmisor GABA puede activar dos tipos de receptores: los receptores ionotrópicos GABA_A y los receptores metabotrópicos GABA_B, los cuales difieren en sus propiedades estructurales, farmacológicas y moleculares.

Los receptores ionotrópicos a GABA, por analogía con los receptores de acetilcolina (Unwin, 1995), se sugiere que están formados por varias subunidades que se ensamblan para formar un pentámero en la membrana plasmática (Nayeem *et al.*, 1994; Chang y Weiss., 1997). A su vez, cada subunidad está formada por un extremo amino terminal extracelular, cuatro segmentos transmembranales y un extremo carboxilo terminal extracelular (Hebert, 1998).

La unión de GABA a los receptores ionotrópicos induce la apertura de un canal permeable a iones cloruro (Figura 2), lo cual desencadena una corriente que va del sitio de mayor a menor concentración de estos iones (Martín y Olsen, 2000).

Los receptores GABA_A (GABA_A-Rs), que pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando, median la neurotransmisión rápida inhibitoria y están ensamblados por cinco subunidades codificadas por una familia de 19 genes: las subunidades α (1-6),

β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ , π y ρ (1-3) (Olsen y Sieghart, 2008). Estas subunidades comparten una similitud en su secuencia aminoacídica del 70-80% entre las isoformas de la misma clase, mientras que entre las diferentes subunidades la similitud es de un 30-40% (Macdonald y Olsen, 1994).

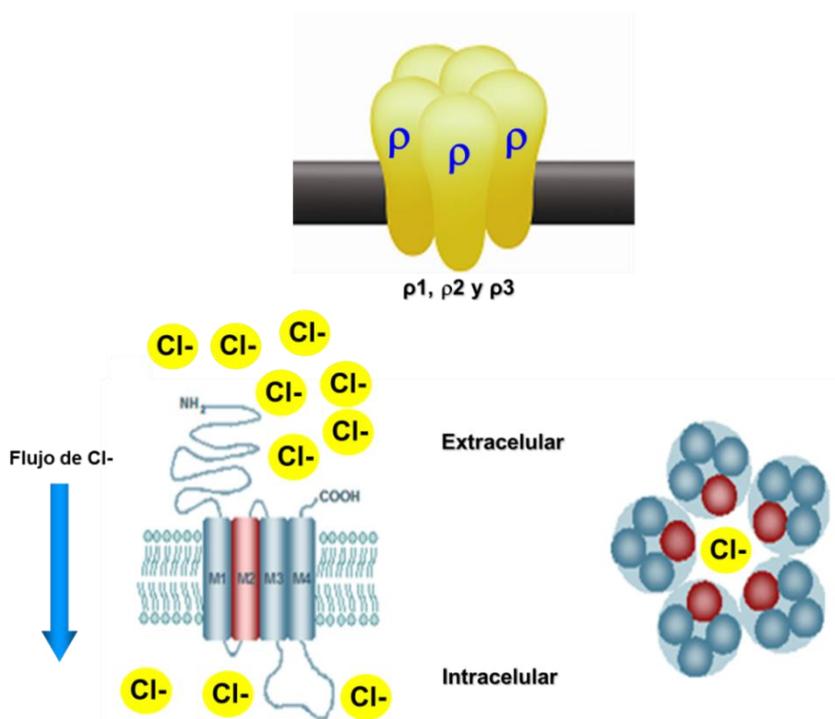


Figura 2. Modelo estructural propuesto para los receptores GABA ρ . El receptor GABA ρ es un pentámero en la membrana de la célula y cada subunidad está formada por un extremo amino terminal extracelular, cuatro segmentos transmembranales y un extremo carboxilo terminal extracelular. La unión del agonista GABA a los receptores ionotrópicos provoca la apertura de un canal permeable a iones cloruro a través del poro.

Las subunidades GABA ρ (también denominados receptores GABA_C) se encuentran clasificadas dentro de los receptores GABA_A y son selectivos a los iones cloruro, se ensamblan en receptores homoméricos funcionales (Martínez-Torres *et al.*, 1998; Martínez-Torres y Miledi, 1999; Watanabe *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 2004; Olsen y Seighart, 2008). Al igual que el resto de las subunidades GABA_A, las subunidades ρ poseen cuatro dominios transmembranales, los dominios C-terminal y N-terminal son extracelulares y el dominio

transmembranal 2 forma el poro por donde pasan los iones cloruro. En la actualidad se cuenta con un modelo estructural básico del receptor GABA ρ 1 (Adamian *et al.*, 2009) y con un modelo *in silico* del homómero del receptor GABA ρ 1 (Estrada-Mondragón *et al.*, 2010).

Los receptores GABA ρ no desensibilizan durante la aplicación continua de GABA, son resistentes a la bicuculina (antagonista de los GABA $_A$ -Rs) e insensibles al baclofeno (agonista de los GABA $_B$ -Rs) (Polenzani *et al.*, 1991; Chebib, 2004) y son activados de manera específica por el CACA y antagonizados por el TPMPA (Ragozzino *et al.*, 1996). En la tabla 1 (Bormann *et al.*, 2000) se muestra un resumen de las diferencias entre estas subunidades.

Tabla 1. Propiedades estructurales, farmacológicas y funcionales de los receptores ionotrópicos GABA $_A$ y GABA ρ

	GABA $_A$	GABA ρ
Permite el paso de iones	Cloruro	Cloruro
Subunidades	α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ y π	ρ 1, ρ 2 y ρ 3
Agonistas	Muscimol, Glicina, CACA, TACA, I4AA, THIP, TAMP, Isoguvacina, Zolpidem	CACA, CAMP, TACA, TAMP, Glicina, β -alanina, 5-Me-IAA, Muscimol
Antagonistas	Bicuculina y Picrotoxina	3-APA, 3-APMPA, TPMPA, P4MPA, P4S, I4AA, THIP, Isoguvacina, Picrotoxina y Zinc
Tiempo medio de apertura	25 a 30 milisegundos	150-200 milisegundos
GABA EC$_{50}$	5-100 μ M	1-4 μ M
Coefficiente de Hill	2	1.8
Tamaño del poro	5.6 Å	5.1 Å

Antecedentes

Expresión de los receptores GABA_A

Muchas son las combinaciones que podrían resultar de las subunidades α , β , γ , δ , ϵ , θ , π y ρ ; sin embargo, la combinación más común es aquella que contiene 2- α , 2- β y 1- γ (Backus *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1996; Jechlinger *et al.*, 1998; Sieghart *et al.*, 1999; Korpi y Sinkkonen, 2006). Según estudios de hibridación *in situ* e inmunocitoquímicas, el perfil de expresión de las subunidades de los GABA_A-Rs varía en las distintas regiones del cerebro en el adulto y en los tipos neuronales durante el desarrollo; por ejemplo, durante etapas prenatales predominan las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\beta 3$, mientras que las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2$ en etapas postnatales (Laurie *et al.*, 1992). En el cerebro adulto, la combinación $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ es la más abundante y la que se expresa de manera más amplia, representando aproximadamente el 40% (Laurie *et al.*, 1992; Wisden *et al.*, 1992; Korpi y Sinkkonen, 2006).

La subunidad $\alpha 1$ se expresa de manera abundante en todas las regiones del cerebro (Whiting, 2003), mientras que el gen de la subunidad $\alpha 2$ se expresa de manera particular en el hipocampo y en el hipotálamo, observando que sus niveles de ARNm son altos durante el desarrollo y van en decline en etapas postanatales, cuando la subunidad $\alpha 1$ aumenta sus niveles (Fuchs y Celepirovic, 2002). La subunidad $\alpha 3$ se expresa en todo el cerebro adulto y en su caso particular, también presenta los niveles superiores en etapas prenatales y se reduce su expresión en etapas postnatales (Mu y Burt, 1999). Subunidades como la $\alpha 4$, se localizan de manera específica en el tálamo y en el giro dentado del hipocampo, la

subunidad $\alpha 5$ en células piramidales del hipocampo (Whiting, 2003), y el ARNm de la subunidad $\alpha 6$ en células granulares del cerebelo (McLean *et al.*, 2000).

Por otro lado, la subunidad $\beta 1$ está presente de manera abundante en el hipocampo y en la corteza, mientras que en menor proporción en el cerebelo (Li y De Blas, 1997). Por su parte, la subunidad $\beta 2$ es un componente de la combinación más abundante de los receptores GABA_A ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$), por lo que se expresa de manera amplia en todas las regiones del cerebro, teniendo un patrón de expresión muy similar al del receptor $\alpha 1$ (Mckinley *et al.*, 1995). La subunidad $\beta 3$ es la isoforma más abundante de las subunidades β y se expresa en el hipocampo, corteza y cerebelo; frecuentemente colocaliza con las subunidades $\beta 1$ o $\beta 2$ (Li y De Blas, 1997).

En el caso de la subunidad $\gamma 1$, su expresión es restringida y en altos niveles en la amígdala, hipotálamo y núcleos premamilares (Herb *et al.*, 1992); el gen de la subunidad $\gamma 2$ se expresa en altos niveles en todo el SNC durante el desarrollo (Whiting, 2003), mientras que el gen de la subunidad $\gamma 3$ se expresa en bajos niveles en el cerebelo y en hipocampo (Herb *et al.*, 1992).

La subunidad δ se expresa de manera abundante en el cerebelo y en el giro dentado (Sommer *et al.*, 1990). El perfil de expresión de la subunidad ε se presenta de manera abundante en regiones como el hipotálamo y el locus ceruleus (Davies *et al.*, 2002). La subunidad θ muestra una distribución muy similar a la subunidad ε (Sinkkonen *et al.*, 2000). De manera particular, la subunidad π se expresa de manera específica en el útero y al parecer está ausente en el cerebro (Hedblom y Kirkness, 1997; Fujii y Mellon, 2001).

El receptor GABA ρ 1 se localiza en distintas regiones del sistema nervioso central (SNC) (Figura 3), incluyendo el tálamo, hipocampo, pituitaria, corteza, cerebelo, núcleo geniculado lateral, colículo superior, espina dorsal, amígdala y estriado; en el sistema nervioso periférico, sistema cardiovascular, sistema gastrointestinal, espermatozoide y glía de Bergmann (Boue-Grabot *et al.*, 1998; Wegelius *et al.*, 1998; Enz y Cutting, 1999; Zhu y Lo, 1999; Boller y Schmidt, 2001; Fletcher *et al.*, 2001; Didelon *et al.*, 2002; Rozzo *et al.*, 2002; Gamelon-Didelon *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008; Mejía *et al.*, 2008; Verkhratsky y Butt, 2008; Rosas-Arellano *et al.*, 2011; Rosas-Arellano *et al.*, 2012).

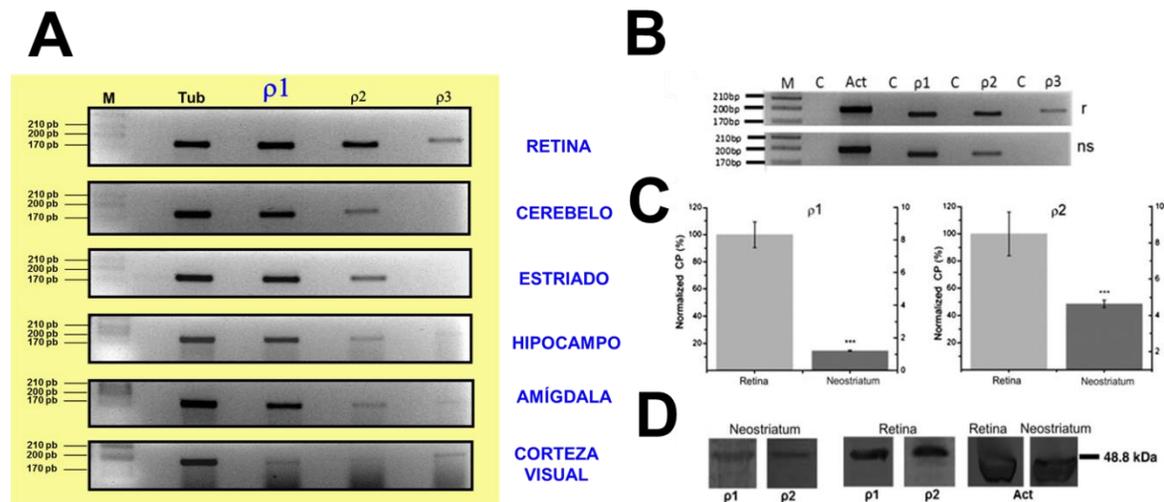


Figura 3. Expresión del receptor GABA ρ 1 en el Sistema Nervioso Central. **A)** RT-PCR de retina, cerebelo, cuerpo estriado, hipocampo, amígdala y corteza visual de ratón adulto indicando la expresión del ARNm de la subunidad GABA ρ 1, así como la expresión diferencial de las subunidades GABA ρ 2 y GABA ρ 3. **B)** RT-PCR de retina y estriado para los genes GABA ρ 1, GABA ρ 2 y GABA ρ 3 usando como control de reacción el gen Actina. **C)** qRT-PCR para los genes GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en estriado tomando como referencia los niveles de expresión de ambos genes en retina. **D)** Western blot para las subunidades GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en estriado y en retina. En este caso, se utilizó la proteína como control (Rosas-Arellano *et al.*, 2011; Rosas-Arellano *et al.*, 2012).

Los receptores GABA ρ han sido ampliamente estudiados, ya que participan de manera crucial como un punto de control a lo largo de la ruta visual. En la retina, el GABA proveniente de las células amacrinas activa los receptores GABA ρ localizados en la terminal axónica de las neuronas bipolares de tipo ON provocando una inhibición de éstas, limitando la liberación de glutamato por parte de las neuronas bipolares hacia las neuronas ganglionares; por lo que, en ausencia de los receptores GABA ρ 1, se altera la transmisión excitatoria (Figura 4).

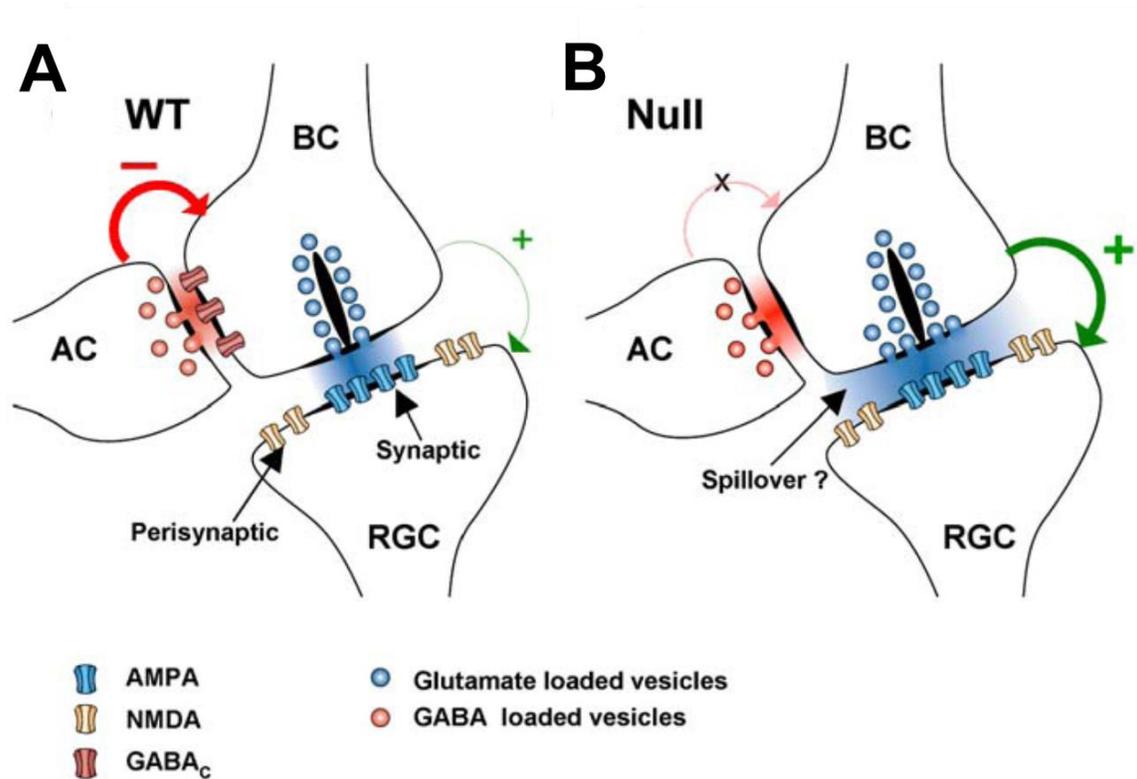


Figura 4. Esquema de la modulación de la liberación de glutamato por parte de las neuronas bipolares en retina. A) En el ratón silvestre, las células amacrinas (AC) liberan GABA, modulando así la liberación de glutamato por parte de las neuronas bipolares de tipo ON (BC) y modulando los receptores ubicados en las dendritas de las células ganglionares (RGC); esto mediante la vía GABAérgica y los receptores GABA ρ . B) En el ratón “knock out” para la subunidad ρ 1, la ausencia de la inhibición mediada por los receptores GABA ρ , la probabilidad de la liberación de glutamato aumenta y la modulación de la transmisión excitatoria se interrumpe (Sagdullaev *et al.*, 2002).

En el ratón knock-out para el gen GABA ρ 1, la inhibición mediada por el receptor es totalmente abatida en la retina, demostrando así su papel en la correcta transmisión neuronal (Qian y Dowling, 1993; Pan y Lipton, 1995; Lukasiewicz, 1996; Koulen *et al.*, 1997; Feigenspan y Bormann, 1998; Fletcher *et al.*, 1998; Ogurusu *et al.*, 1999; McGillem *et al.*, 2000; McCall *et al.*, 2002; Sagdullaev *et al.*, 2006).

En el cerebelo, se sugiere que las subunidades GABA ρ tienen una contribución en la inhibición tónica GABAérgica (Harvey *et al.*, 2006). Las subunidades GABA ρ son codificadas por tres genes: en el ratón, los genes GABA ρ 1 y GABA ρ 2 se localizan en tándem en el cromosoma 4 (Figura 5B), y separados aproximadamente por 40-kb (Greka *et al.*, 2000), mientras que el gen que codifica para la subunidad GABA ρ 3 se encuentra en el cromosoma 16. El ADNc de la subunidad ρ 1 de ratón consta de 2,280 pb (Cutting *et al.*, 1992).

De las subunidades GABA ρ se han clonado sus ADNc de varios vertebrados, incluyendo el humano (Zhang *et al.*, 1995, Greka *et al.*, 1998; Martínez-Torres *et al.*, 1998). En el ser humano, la subunidad ρ 1 es codificada por el gen *GABRR1* localizado en el cromosoma 6 (Bailey *et al.*, 1999) y, en la rata, en el cromosoma 5 (Cutting *et al.*, 1992).

Durante el desarrollo de la retina de ratón, el ARNm de la subunidad GABA ρ 1 es expresado de manera abundante en las neuronas bipolares de tipo ON después del día postnatal 7, mientras que la subunidad ρ 2 lo hace a partir del día postnatal 10 (Figura 5A y 5C) (Greka *et al.*, 2000; Wu y Cutting, 2001; Kim *et al.*, 2008). También hay evidencia que revela una expresión diferencial de los receptores GABA ρ durante el desarrollo en el cerebelo, ya que, en esta región, la expresión de ρ 1 y ρ 2 es constante y la de ρ 3 aumenta de

manera significativa en etapas adultas; esto, en células de canasta y Purkinje (Mejía *et al.*, 2008); sin embargo, la regulación transcripcional de estos genes es poco conocida.

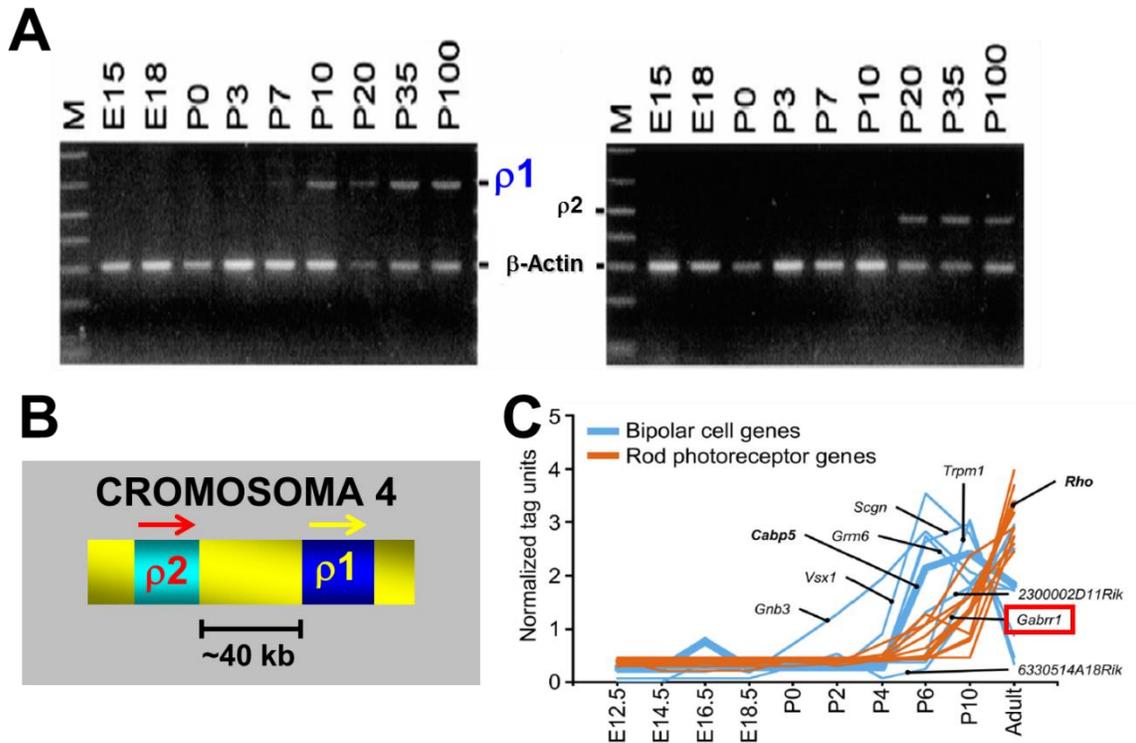


Figura 5. Expresión de las subunidades GABA ρ 1 y GABA ρ 2 de ratón. A) RT-PCR de las subunidades ρ 1 y ρ 2 en donde se observa que ρ 1 es expresado desde P7 mientras que ρ 2 se activa en P10, esto en distintas etapas del desarrollo de la retina de ratón (Wu y Cutting, 2001) **B)** Localización de los genes GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en el cromosoma 4 del ratón. Las subunidades ρ 1 y ρ 2 se encuentran en tándem y separadas por una región de aproximadamente 40 kb entre ambas secuencias codificantes. **C)** qRT-PCR de retina indicando que la expresión de GABA ρ 1 aumenta de manera considerable a partir de P7 (Kim *et al.*, 2008).

Promotores de los genes GABA_A

Dentro de este control de expresión espacio-temporal de los genes, participan los promotores transcripcionales, los cuales son secuencias de ADN necesarias para el inicio de la síntesis de ARN y que alteran los niveles de transcripción.

La regulación de la expresión génica se puede dar en distintos puntos dentro de la célula; entre ellos: la transcripción, “splicing alternativo”, estabilidad del ARNm, traducción, modificaciones postraduccionales, tráfico intracelular y degradación de la proteína, aunque la forma predominante y la más estudiada de regulación es a nivel del inicio de la transcripción, la cual depende de factores de transcripción (FT) que se unen a secuencias específicas de ADN (Steiger y Russek, 2004).

Los genes GABA_A de vertebrados están agrupados y conservados con una estructura básica de 9 exones (Tsang *et al.*, 2007). Datos computacionales y experimentales revelan que aproximadamente el 50% de los promotores GABA_A-R contienen islas CpG, elementos Inr y caja TATA. Los promotores basales de algunos genes GABA_A se localizan 100-500 pb río arriba del codón de inicio de traducción (Steiger y Russek, 2004; Joyce, 2007).

Subunidades α

El gen humano de la subunidad $\alpha 1$ posee un elemento promotor mínimo de 60 pb en la región 5' del gen, el cual se reprime al ser expuesto de manera crónica con benzodiazepinas (Kang *et al.*, 1994). En el pollo se ha reportado el TSS del gen y algunos elementos putativos del promotor, como una caja TATA ubicada 30 pb río arriba del TSS, sitios de unión para SP1, una caja CCAAT reversa y un alto contenido de GC (Bateson *et al.*, 1995).

Para el gen de la subunidad $\alpha 2$ se han identificado 6 isoformas del ARNm con distintos UTRs 5' generados de tres exones 1 alternativos, producto de splicing alternativo y

promotores alternativos, así como múltiples TSS; la región es rica en dinucleótidos GC elementos INR y sitios de unión a FT como SP1 (Fuchs y Celepirovic, 2002).

El promotor del gen $\alpha 3$ contiene una serie de repeticiones GA 40 pb río arriba del TSS, a la cual se unen proteínas nucleares que directamente incrementan la transcripción, así como una serie de repeticiones GC, las cuales forman parte de un sitio putativo para el FT E2F, que también contribuye a la actividad del promotor (Mu y Burt, 1999).

En el caso del gen $\alpha 4$, se han determinado su promotor mínimo, el TSS y el codón de inicio ATG, así como dos sitios SP1 que son fundamentales para la actividad del promotor *in vivo* y a los cuales se unen los FT SP3 y SP4 para aumentar la expresión de la subunidad $\alpha 4$ en neuronas. Se destaca que cuando se eliminan otros posibles sitios de unión para FT como SP1, AP1, cMyb y cajas E, los niveles de transcripción no se ven alterados (Ma *et al.*, 2004).

El ARNm del gen $\alpha 5$ de humano también presenta tres isoformas, las cuales resultan de tres exones alternativos y cada exón es regulado por un promotor distinto. En el promotor está incluida una isla CpG y contiene un gran número de posibles sitios de unión para FT, por ejemplo SP1, AP1 y AP2 (Kim *et al.*, 1997).

Para el promotor del gen de la subunidad $\alpha 6$ en rata, se determinó que un fragmento de 155 pb corresponde al promotor mínimo y que una región de 60 pb ubicada 70 pb río arriba del TSS aumenta la transcripción de manera específica en las células granulares de cerebelo. Esta región es dependiente de la posición del TSS y contiene un NF1 conservado, así como una región río abajo que regula de manera negativa en células granulares pero de manera positiva en fibroblastos (McLean *et al.*, 2000). De hecho, este FT es abundante en células granulares del cerebelo y se une al promotor *in vivo* en el gen del ratón, confirmando así su

importancia en la expresión de esta subunidad en las células granulares y en la diferenciación de estas (Wang *et al.*, 2004).

Subunidades β

El gen humano de la subunidad $\beta 1$ contiene una región promotora de 270 pb sin caja TATA, es específico para neuronas e incluye un Inr que es fundamental para la actividad del promotor. Río arriba del Inr se localiza una secuencia consenso GRE, la cual tiene un efecto regulatorio positivo específico para neuronas, mientras que los sitios CCAAT e IK2 tienen efectos regulatorios negativos. En este caso particular se ha observado que una activación persistente con GABA produce una baja en la transcripción del ARNm de la subunidad $\beta 1$. Al parecer, la exposición a GABA reduce directamente la actividad del promotor modulando la unión de los FT basales al Inr del promotor y, por lo tanto, regulando la formación del complejo de pre-iniciación (Russek *et al.*, 2000).

Para el gen de la subunidad $\beta 2$ no se cuenta con información acerca de su región promotora y regulación transcripcional, sin embargo se sabe que presenta “splicing” alternativo con el cual se generan dos transcritos que difieren por un fragmento de 114 pb (McKinley *et al.*, 1995).

Las regiones promotoras y codificantes de la subunidad $\beta 3$ están altamente conservadas en el humano y en la rata. En el humano, el gen de la subunidad $\beta 3$ presenta dos isoformas que se expresan de manera diferencial durante el desarrollo y en distintas regiones del cerebro que codifican para dos péptidos diferentes (Kirkness y Fraser, 1993).

Subunidades γ

Las regiones promotoras de los genes de las subunidades γ_1 y γ_3 no han sido caracterizadas experimentalmente. Por otro lado, para el gen γ_2 se ha reportado un promotor sin caja TATA con dos TSS. Para esta subunidad se generan dos subtipos a partir de splicing alternativo, los cuales se expresan de manera diferencial durante el desarrollo y en distintas regiones. El primer intrón, tanto en humano como en ratón, contiene un elemento silenciador restrictivo de neuronas (por sus siglas en inglés, neuron-restrictive silencer element, NRSE), al cual se une el NRSF (por sus siglas en inglés, neuron-restrictive silencer factor) para su expresión en neuronas y represión en células no neuronales. Otro sitio importante es el GPE1 (por sus siglas en inglés, Gamma promoter element), el cual activa la expresión de la subunidad γ_2 y se ubica 70 pb río abajo del segundo TSS; así como un sitio CREB (cAMP-responsive element binding protein) (Mu y Burt, 1999).

Subunidades δ , ϵ , θ y π

El extremo 5' del gen de la subunidad δ murino contiene una región con características de isla CpG y carece de caja TATA (Sommer *et al.*, 1990). En el caso de la rata, el promotor del gen de la subunidad δ se ubica dentro de una isla CpG y un elemento Inr que se ubica próximo al TSS. También se identificó un elemento rico en purinas de 22 pb presente en siete copias sobrelapadas parcialmente, ubicado 1,800 nucleótidos río arriba del TSS. A este sitio se une el “factor específico de cerebro” (brain-specific factor, BSF1) que se expresa de manera predominante en células granulares del cerebelo; sin embargo, aún no es claro si este FT participa en la regulación de la expresión del gen de la subunidad δ (Motejlek *et al.*, 1994).

Hasta el momento se desconoce alguna región promotora descrita de manera experimental de las subunidades ϵ , θ y π .

Subunidades ρ

Al no contar con información detallada acerca de la regulación transcripcional y de los elementos moleculares que activan la transcripción de las subunidades GABA ρ , estudios *in silico* en nuestro laboratorio indicaron que la región flanqueante 5' del gen GABA ρ 1 carece de una caja TATA, contiene elementos iniciadores (Inr) y cuenta con algunos sitios de unión a factores de transcripción de tipo general (SP1 y AP1), los cuales están bien conservados en el humano, rata y ratón.

En este trabajo nos enfocamos a la subunidad GABA ρ 1, ya que su ARNm es abundante en la retina, y se conoce su papel en este tejido de manera clara y definida, así como su distribución en el SN y fuera de este; por lo que, en la presente investigación, se caracterizó la región promotora del gen GABA ρ 1 que permite su expresión en las células STC-1 y en retina.

Importancia

Ya que algunas alteraciones en los niveles de expresión de los GABA_A-Rs han sido relacionadas con algunas enfermedades psiquiátricas y neurológicas como la epilepsia (Loup *et al.*, 2000), Alzheimer (Mizukami *et al.*, 1997, 1998a, b) y esquizofrenia (Akbarian *et al.*, 1995; Huntsman *et al.*, 1998; Ohnuma *et al.*, 1999), así como del desarrollo de los fotorreceptores en la retina de vertebrados (Young y Cepko, 2004), la regulación de la migración radial en la neocorteza de ratón (Denter *et al.*, 2010), además de su rol en la retina para limitar la liberación de glutamato a las células ganglionares (Sagdullaev *et al.*, 2006), el entendimiento de la regulación transcripcional de los genes GABA_A, en particular el gen GABA ρ 1, puede ofrecer un entendimiento de los mecanismos que contribuyen a la etiología de desórdenes neurológicos, sus respuestas a tratamiento con algunos medicamentos, desarrollo y maduración del cerebro y la retina.

Hipótesis

Dentro del fragmento de 3kb ubicado río arriba de la secuencia codificante del gen GABA ρ 1 se localiza la región promotora del gen que activa su transcripción en neuronas bipolares de la retina y en células STC-1.

Objetivos

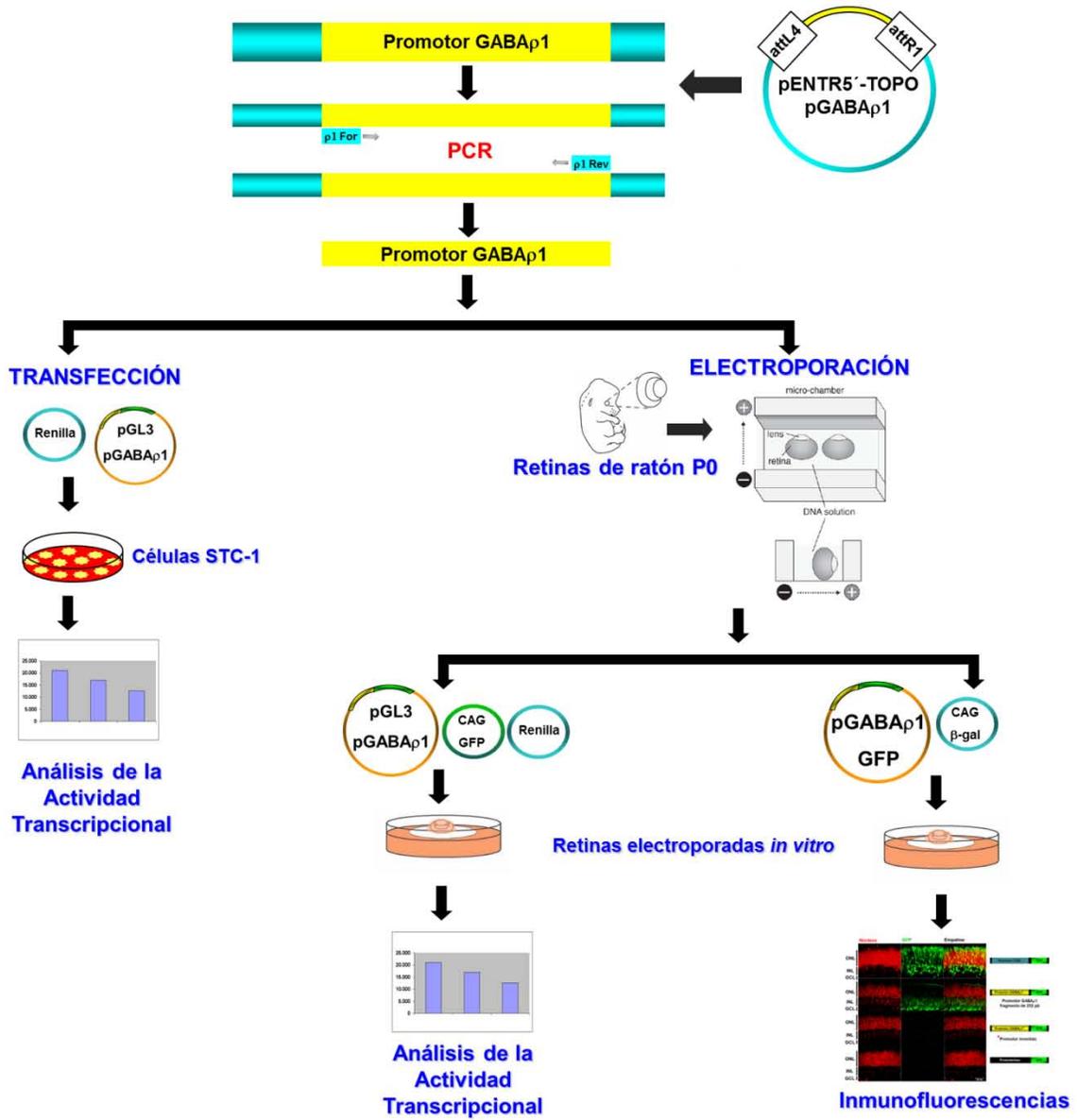
General

Identificar el promotor transcripcional del gen GABA ρ 1 que permite la síntesis y expresión del ARNm en neuronas bipolares de retina y en células STC-1.

Particulares

- Identificar los sitios de inicio de transcripción del gen GABA ρ 1.
- Determinar la mínima región promotora del gen GABA ρ 1 capaz de activar la transcripción en neuronas bipolares y en células STC-1.
- Definir los elementos *cis*-reguladores involucrados en la transcripción del gen GABA ρ 1.
- Especificar la capa y el tipo celular en la que el promotor GABA ρ 1 activa la transcripción en la retina de ratón.

Estrategia general



Materiales y Métodos

Animales y disección de retinas

Colonias de ratones de la cepa CD1 fueron reproducidas y alojadas en el bioterio del INB-UNAM. Los ratones recién nacidos se sacrificaron de acuerdo con las políticas éticas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ojos fueron removidos y las retinas se aislaron mecánicamente, colectando de 3 a 5 retinas por vial, se congelaron con hielo seco y fueron almacenadas a -80°C hasta su uso posterior.

Extracción de ARN y qRT-PCR

El ARN total fue extraído al menos tres veces procesando aproximadamente 300-500 mg de retina usando el reactivo TRIzol[®] (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante y resuspendido en H₂O tratada con DEPC. La concentración se cuantificó por Espectrofotometría y la calidad e integridad del ARN se observaron en un gel de agarosa al 1%. Para la síntesis del ADNc se usó la enzima SuperScript[™] II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen).

Para esta reacción, se prepararon dos mezclas; la mezcla 1 incluyó 1 μg de ARN total, 1 μl de oligo dT 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Invitrogen), 1 μl de mezcla de dNTP's a 10 mM y H₂O tratada con DEPC para completar un volumen final de 13 μl . La mezcla 2 incluyó 4 μl del Buffer Strand 5X (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ a pH 8.3), 2 μl de DTT 0.1 M y 1 μl de la enzima SuperScript[™] II. La mezcla 1 se calentó a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ARN e inmediatamente después, se colocó en hielo y posteriormente la mezcla 2 se agregó a la mezcla 1. La reacción se incubó a 42°C durante 50 minutos y posteriormente se inactivó la reacción a 70°C durante 15 minutos.

Para las qRT-PCR, los niveles de expresión del ARNm de GABA ρ 1 fueron comparados y determinados para ratones machos P0 usando el sistema LightCyclerTM (Roche Diagnostics, Indianapolis IN, USA). Los oligos fueron calibrados con diluciones seriadas del ADNc para determinar la relación entre el número de ciclos (Ct) y la expresión del ARNm del gen GABA ρ 1. Dos muestras sintetizadas de manera independiente fueron preparadas y las amplificaciones se llevaron a cabo por triplicado.

El estuche comercial “Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR[®] Green I” fue usado para llevar a cabo las reacciones con los genes de Actina y RplP0 como estándares. Las reacciones incluyeron 5 μ l del ADNc, MgCl₂ a 2.5 mM, 250 μ M de los oligos sentido y antisentido (Tabla 2), 1 μ l de SYBR[®] Green Taq ReadyMixTM y 2 μ l de agua para una reacción con un volumen total de 10 μ l. Las condiciones de la reacción fueron 95°C durante 10 minutos para un ciclo (hot start), 40 ciclos de 95°C 10 segundos, 60°C 10 segundos y 72°C 12 segundos.

9 μ l de cada producto de PCR fueron visualizados en un gel de garosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos usados en la qRT-PCR para amplificar los genes RplP0, actina y GABA ρ 1.

Gen	Oligo sentido	Oligo antisentido	Producto	Número de acceso
RplP0	5'-TGCAGCAGATCCGCATGTCGC-3'	5'-TCCCGAATCTCAGTGAGGTCC-3'	181-pb	NM_007475
Act	5'-GGCTACAGCTTACCACCACAGC-3'	5'-GACTCGGAACCGCTCGTTGC-3'	183-pb	AK075973
ρ 1	5'-CGAGGAGCACACGACGATGCC-3'	5'-CTGCACATCCACGCCACAGG-3'	174-pb	NM_008075

Ensayo 5'-RACE

2 µg de ARN total aislados de retinas de ratón macho adulto fueron utilizados para identificar los sitios de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés Transcription Start Sites) con el estuche comercial GeneRacer™ (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ARN total fue sometido con enzimas para eliminar los ARNm truncos, el resto de los ARNs y el capuchón localizado 5'. El fosfato 5' fue ligado al oligo de ARN GeneRacer usando la ligasa de ARN T4 y el oligo dT se usó para la síntesis de ADNc.

La PCR se llevó acabo con el oligo RACE2 (Tabla 3), con el paso de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, seguido de 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 2 minutos a 68°C.

El oligo RACE1 (Tabla 3) se usó para la PCR anidada con las mismas condiciones. Los productos de PCR fueron purificados y clonados en el vector pCR®4-TOPO® (Invitrogen).

Para identificar los TSS, 26 clonas de RACE fueron secuenciadas y alineadas con la secuencia genómica de GABA ρ 1 usando el programa ClustalW2.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos usados en el ensayo 5'-RACE para amplificar el UTR-5' del gen GABA ρ 1.

Oligo	Secuencia	Ubicación
RACE 1	5'-TCTGAGGTCTGCTGCCTTCC-3'	91 pb río abajo del codón de inicio ATG
RACE 2	5'-TCAGCAGCTGCTCAGACTTGG-3'	199 pb río abajo del codón de inicio ATG

Generación de plásmidos

Para la construcción del vector pBlue-TOPO[®]pGABA ρ 1 3-kb, el fragmento de 3-kb fue amplificado mediante PCR a partir de ADN genómico aislado de ratones machos CD1 y clonado en el vector pBlue-TOPO[®] vector (Invitrogen). El producto de PCR fue purificado usando el estuche comercial illustra[™] GFX[™] PCR DNA and GEL Band Purification Kit (GE). Las subsecuentes construcciones se obtuvieron mediante PCR usando como templado el fragmento de 3-kb. Los oligos utilizados para estas construcciones se muestran en la tabla 4.

Para las construcciones con luciferasa, los productos de la digestión con *BamHI* y *HindIII* fueron ligados en el vector pGL3 Basic vector (pGL-BV) en los sitios *BglIII* y *HindIII*. Las delecciones y las mutantes fueron generadas con el protocolo Exsite PCR con la enzima *DpnI* a partir del plásmido pGL3pGABA ρ 1 0.232kb usando los oligos de la tabla 4.

El promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb y el promotor invertido GABA ρ 1 de 0.232-kb fueron subclonados del vector pGL3pGABA ρ 1 0.232kb en los sitios *Sal/Sal* del vector CAG-GFP (donado por la Dra. C. L. Cepko) para producir las construcciones con el promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb fusionado a GFP y el promotor GABA ρ 1 invertido de 0.232-kb fusionado a GFP.

Todas las construcciones fueron confirmadas mediante secuenciación. Las secuencias de ADN genómico de ratón, rata y humano fueron obtenidas de la base de datos del sitio de genomas del NCBI. Los análisis de las secuencias de ADN se llevaron a cabo usando el programa MotifViz y el TRANSFAC data-bases para predecir posibles sitios de unión para Factores de Transcripción.

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos usados para la generación de las clonas con las diferentes versiones del promotor GABA ρ 1 dirigiendo de manera independiente la expresión de los genes reporteros β -gal y luciferasa.

Vector	Oligo	Secuencia
pBlue-TOPO [®] pGABA ρ 1 3kb	pGABA ρ 1 3kb y pGABA ρ 1	5'-ACCGACAGATTTTGTTCCTTGATCCACACA-3' 5'-ATTCTGGACAGCCAACATAGATTCCCAAAT-3'
pBlue-TOPO [®] pGABA ρ 1 2kb	pGABA ρ 1 2kb y pGABA ρ 1	5'-GTGTTCCAGTTGGGTTACTAACTTTTTCAA-3'
pBlue-TOPO [®] pGABA ρ 1 1kb	pGABA ρ 1 1kb y pGABA ρ 1	5'-GCTACTTTCTTGGCTCATCAATGTAGTCTT-3'
pBlue-TOPO [®] pGABA ρ 1 0.232kb	pGABA ρ 1 232bp y pGABA ρ 1	5'-AGAAAATCCCTGACATCTGACGC-3'
pBlue-TOPO [®] pGABA ρ 1 0.131kb	pGABA ρ 1 131bp y pGABA ρ 1	5'-AAACATCCTTCTAATAACAAACACAGC-3'
pGL3pGABA ρ 1 0.232kb Δ SP1	pGABA ρ 1 Δ SP1for y pGABA ρ 1 Δ SP1rev	5'-TTAGTGGAAATTGCTTCTCCC-3' 5'-AAATCCCCCTGCGTCAGATGTCAGG-3'
pGL3pGABA ρ 1 0.232kb Δ Inr-A	pGABA ρ 1 Δ InrAfor y pGABA ρ 1 Δ InrArev	5'-CGCTGGCCAGATTACTGACTGCAGC-3' 5'-AGCAATTTCCACTAACCCCGCAAATCC-3'
pGL3pGABA ρ 1 0.232kb Δ Inr-B	pGABA ρ 1 Δ InrBfor y pGABA ρ 1 Δ InrBrev	5'-CGCAGGGTAAACATCCTTCTAATAAC-3' 5'-AAGCTGCAGTCAGTAATCTGGCCAGC-3'
pGL3pGABA ρ 1 0.232kb Δ AP1	pGABA ρ 1 Δ AP1for y pGABA ρ 1 Δ AP1rev	5'-CAGCTTCATTTTCGCAGGGTAAAC-3' 5'-GTAATCTGGCCAGCGGGAGAAAGC-3'
pGL3pGABA ρ 1 0.232kb Δ SRY	pGABA ρ 1 Δ SRYfor y pGABA ρ 1 Δ SRYrev	5'-ACAGCAATGATGCCTTAAGAGAGGG-3' 5'-TTAGAAGGATGTTTACCCTGCG-3'
pGL3pGABA ρ 1 0.232kb mInr-B	pGABA ρ 1mInrBfor y pGABA ρ 1 Δ InrBrev	5'- <u>GGTG</u> TTCGCAGGGTAAACATCC-3'
pGL3pGABA ρ 1 0.232kb mAP1	pGABA ρ 1mAP1for y pGABA ρ 1 Δ AP1rev	5'- <u>AGCTCC</u> CAGCTTCATTTTCGC-3'
pGL3pGABA ρ 1 0.232kb 2mut	pGABA ρ 1 2mutfor y pGABA ρ 1 Δ AP1rev	5'- <u>AGCTCC</u> CAGCTT <u>GGTG</u> TTCGCAGG-3'

Transformación de bacterias con los ADNs plasmídicos

Para la transformación de las bacterias *E. coli* Ca⁺⁺ competentes se utilizó el método descrito por Sambrook *et al.* 2001; se agregaron los plásmido a alícuotas de 50 μ l de bacterias Ca⁺⁺ competentes y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Pasado el tiempo de incubación, se dio un choque térmico de 90 segundos durante 30 segundos a 42°C y se incubaron inmediatamente en hielo durante 5 minutos, posteriormente se añadieron 200 μ l de medio LB y se dejaron durante 25 minutos a 37°C y después 25 minutos en agitación a 250 rpm a 37°C. Al término de este tiempo se sembraron en placas con agar LB más ampicilina a 50 mg/ml e incubadas a 37°C durante toda la noche.

Obtención de los ADNs plasmídicos mediante minipreparación

Las colonias bacterianas obtenidas de la transformación de los plásmidos fueron levantadas, se inocularon en tubos de ensayo con 4 ml de medio LB y 8 μ l de ampicilina 50 mg/ml. Los tubos fueron puestos en agitación constante a 250 rpm a 37°C por 14-16 horas para la posterior obtención de los ADNs plasmídicos por el método de lisis alcalina modificado de Birnboim y Doly en 1979 que se describe a continuación: un volumen de 1.5 ml de cada cultivo bacteriano fue colocado en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Los cultivos se centrifugaron por 2 minutos a 14,000 rpm (este paso se realizó dos veces para procesar los 3 ml de medio LB), se desechó el sobrenadante y se les agregaron 200 μ l de solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8), los paquetes celulares se resuspendieron mediante agitación con vortex y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se les añadieron 200 μ l de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%), se mezclaron por inversión, y se incubaron 3 minutos en hielo. Se les adicionaron posteriormente 200 μ l de solución III (KOAc 5 M, CH₃COOH) se agitaron por inversión y se incubaron durante 10 minutos en hielo. Pasado el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 14,000 rpm y los sobrenadantes, que contenían los ADNs plasmídicos, se transfirieron a tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml y se les agregaron 2.5 volúmenes de isopropanol al 100%, se agitaron los tubos por inversión y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente para que los ADNs plasmídicos se precipitaran al fondo del tubo.

Terminada la incubación, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 14,000 rpm, se descartaron los sobrenadantes y las pastillas se lavaron dos veces con 300 μ l de etanol al 70% mediante vortex, después se centrifugaron por 5 minutos a 14,000 rpm, se eliminó completamente el sobrenadante y se secaron a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Finalmente, los ADN_s plasmídicos fueron resuspendidos en 30 µl de H₂O miliQ que contenía RNAsa a una concentración final de 0.02 mg/ml. Los ADN_s aislados fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

Purificación de los ADN_s recombinantes usando columnas de QIAGEN

Los ADN_s plasmídicos se purificaron mediante midipreparación usando las columnas del Kit de Qiagen (Qiagen[®] Plasmid Handbook, Valencia, CA, E.U.A). El protocolo se basa en un procedimiento descrito por el proveedor, el cual consistió en inocular 5 µl de cultivo bacteriano con los plásmidos de interés (previamente crecido en 4 ml de LB con ampicilina) en 50 ml de LB con 100 µl de ampicilina 50 mg/ml y se incubaron a 37°C durante 12 horas a 250 rpm.

Posteriormente, los cultivos de bacterias se transfirieron a tubos de 50 ml, se centrifugaron por 7 minutos a 5,000 rpm, se retiraron los sobrenadantes por decantación y los paquetes celulares se resuspendieron totalmente con 4 ml de Buffer P1 mediante pipeteo y vortex, inmediatamente después se les agregaron 4 ml de Buffer P2, se agitaron por inversión 6 veces y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 4 ml de Buffer P3, también se agitaron 6 veces y se dejaron en hielo por 10 minutos.

Los lisados celulares fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 30 minutos a 4°C; al mismo tiempo se equilibraron columnas de Qiagen aplicando 4 ml de Buffer QBT y los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación se colocaron en las columnas equilibradas dejando que pasaran por fuerza de gravedad. Los ADN_s unidos en las columnas se eluyeron en tubos de 50 ml agregando 5 ml de Buffer QF y para precipitarlos se agregaron 0.7

volúmenes (3.5 ml) de isopropanol absoluto y se mezclaron por inversión para después ser centrifugados a 9,500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se decantaron cuidadosamente, las pastillas de ADN se lavaron con 5 ml de etanol al 70% centrifugándose, posteriormente a 9,500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente, las pastillas de ADN se secaron a 37°C por 5 minutos y se resuspendieron en aproximadamente 100 µl de H₂O miliQ.

El análisis de calidad y concentración de los ADN purificados se realizó mediante absorbancia con luz ultravioleta a 260 y 280 nm usando una dilución 1:100 y se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7%.

Cultivos celulares, transfecciones y ensayos de los genes reporteros

Las líneas celulares 3T3, GT1-7 y HEK293 fueron cultivadas en medio Dulbecco's modified Eagle medium, (DMEM; Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, fetal bovine serum; Hyclone, Logan, UT), penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Gibco). Las células STC-1 fueron cultivadas DMEM suplementadas con 15% de suero de caballo, 2.5% FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Todos los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂.

Al menos dos preparaciones independientes de cada plásmido fueron utilizadas para las transfecciones. 1 µg de ADN plasmídico fue co-transfectado con 100 ng del plásmido pRL-CMV (Promega), el cual contiene el promotor CMV dirigiendo la expresión de la luciferasa de Renilla y permitió normalizar la eficiencia de transfección. Las transfecciones se llevaron a cabo con 4.5 µl of Lipofectamina 2000 (Invitrogen) por pozo en cajas de 6 pozos. Posteriormente, las células fueron extraídas 48 horas post transfección y se procedió

a cuantificar la actividad de la enzima luciferasa usando el luminómetro (Turner Designs) con el estuche comercial Dual-Luciferase reporter assay system (Promega). El plásmido pGL3-basic (pGL-BV, Promega) no contiene promotor y se utilizó como control negativo. Por otro lado, el plásmido pGL3, el cual contiene el promotor SV40, se usó como control positivo para comparar la fuerza del promotor.

Electroporación

Las retinas obtenidas de ratones P0 se colocaron en 50% DMEM/50% F-12 (Gibco, Grand Island, NY) y se transfirieron a una cámara de micro electroporación, la cual contiene la solución de ADN plasmídico: 5 µg del vector pCAG-GFP como control interno de electroporación, 5 µg del plásmido pRL-CMV para la normalización y 10 µg de las construcciones que contienen las diferentes versiones del promotor GABA α 1 dirigiendo la expresión de luciferasa. El protocolo de electroporación incluyó 5 pulsos de 25 V, 50 milisegundos, separados 950 milisegundos usando el electroporador BTX ECM 360. 2 retinas por plásmido fueron electroporadas en cada ensayo. Una vez electroporadas, se cultivaron en filtros de policarbonato Nucleopore (Whatman, 0.2 mm pore size) a 37°C y 5% de CO $_2$ con 50% DMEM/50% F-12 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Hyclone, Logan, UT), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml (Gibco) y L-Glutamina (Invitrogen). Las retinas fueron procesadas 10-12 días post electroporación.

Para los cultivos organotípicos de cerebelo, los cerebros de ratones machos P6 se rebanaron (cortes sagitales de 250 µm) en medio de líquido cerebroespinal artificial frío bajo en sodio ACSF (por sus siglas en inglés, Artificial Cerebrospinal Fluid medium), el

cual contiene 1 mM de CaCl₂, 10 mM de D-Glucosa, 4 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 26 mM de bicarbonato de sodio, 246 mM de sacarosa y solución rojo fenol (1:1000), pH 7.3 previamente oxigenado con Carbogen (95% oxígeno y 5% CO₂). Las rebanadas fueron transferidas a una cámara de micro electroporación, la cual contiene la solución de ADN plasmídico: 13 µg del vector pCAG-β-gal como control interno y 20 µg de las construcciones que contienen el promotor GABA_ρ1 dirigiendo la expresión de GFP. El protocolo de electroporación incluyó 5 pulsos de 85 V, 50 milisegundos, cada uno separado 500 milisegundos usando el electroporador BTX ECM 360. 2 rebanadas por plásmido fueron electroporadas para cada ensayo y cultivadas en insertos en platos de cultivo de c30 con poros de 0.4 µm y 1.1 ml de medio de cultivo (75% Minimum Essential Medium Eagle (MEM), 25% de suero de caballo, 25 mM de HEPES, 1 mM de glutamina, 5 mg/ml de glucosa, penicilina (100 U/ ml) y estreptomycin (100 U/ml) durante 8 días.

Inmunofluorescencia

Las retinas fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos y después crioprotegidas en 30% de sacarosa toda la noche a 4°C. Después, las retinas fueron embebidas en el compuesto O. C. T., congeladas con hielo seco y almacenadas a -80°C. El tejido fue seccionado en un criostato (rebanadas de 20 µm). Para las inmunofluorescencias, las rebanadas fueron lavadas en PBS 1X durante 5 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con una solución al 5% de suero de cabra en PBST (PBS 1X y Tween 20 al 0.1%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en la solución de bloqueo. Los anticuerpos utilizados fueron: pollo anti-GFP Abcam ab13970 (1:500), conejo anti-PKCalpha Sigma-Aldrich P4334-.2ML (1:500) e

incubados toda la noche a 4°C en la oscuridad. La solución se removió y las laminillas se lavaron con PBST tres veces durante 15 minutos cada lavado a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios (Jackson ImmunoResearch) se diluyeron en la solución de bloqueo: cabra anti-pollo alexa488 103-545-155 (1.25:500) y cabra anti-conejo Cy3 111-165-144 (1:250) e incubadas de nuevo toda la noche a 4°C en la oscuridad. Las laminillas fueron lavadas con PBST dos veces durante 15 minutos a temperatura ambiente y contrateñidas con ioduro de propidio o DAPI durante 15 minutos. Las laminillas se montaron usando Vectashield H-100 (Vector Laboratories) y las imágenes se tomaron en un microscopio confocal Zeiss LSM510 Meta.

Análisis estadístico de los datos

Los resultados de las qRT-PCR fueron analizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se muestra como la media con el error estándar. Se aplicó un ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey usando el programa GraphPad Prism 5. Para los ensayos de transfección, las Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU) se presentan como las medias con su error estándar, considerando que las muestras fueron medidas de 7-12 veces por duplicado de manera independiente; en el caso de los ensayos con las delecciones y las mutantes puntuales, las muestras fueron medidas 5 veces por duplicado; para las electroporaciones *in vitro* de retinas, las mediciones se realizaron 4 veces por duplicado. Los valores de la actividad de la luciferasa fueron analizados usando la prueba de Mann-Whitney U con la ayuda del programa GraphPad Prism 5. Las medias fueron comparadas considerando un valor de $p \leq 0.05$ como diferencia significativa (media \pm Error Estándar).

Resultados

Análisis *in silico* e identificación de los sitios de inicio de la transcripción del gen GABA ρ 1

Un primer análisis de las secuencias que se ubican 5' de la secuencia codificante del gen GABA ρ 1 reveló un 88% de similitud entre las secuencias del ratón y de la rata, mientras que las secuencias del ratón y el humano un 64%; cabe destacar que no se identificó ninguna caja TATA. Se identificaron posibles sitios de unión para factores de transcripción, entre ellos AP1, AP2, Ik-2, SP1, SRY y E2F-myc, así como dos elementos iniciadores de la transcripción (Inr) bien conservados en el ratón, la rata y el humano (Figura 6A).

Posteriormente, se usó ARN total de retina de ratón adulto para identificar los sitios de inicio de la transcripción del gen GABA ρ 1. Los productos de RACE obtenidos mediante PCR derivados de ARN mensajeros completos e íntegros fueron 3 de diversos tamaños, lo cual sugirió múltiples TSS para el gene GABA ρ 1 en la retina de ratón (Figura 6B). Los tres TSS se muestran en la Figura 6C, el TSS de 159 bp, el cual representa el 46% de las clonas RACE, el de 164 bp un 27% y el de 181 bp un 27%. Se designó como la posición +1 el primer nucleótido (la A, adenina) de la clona RACE de 159 pb, la cual representó el transcrito más abundante (Figura 6D).

Realizando alineamientos de las secuencias obtenidas con el 5'-RACE con el ADN genómico de ratón se logró observar que los tres TSSs están agrupados en el primer exón sin interrupciones, indicando que no hay ningún intrón presente en el extremo 5' del gen GABA ρ 1.

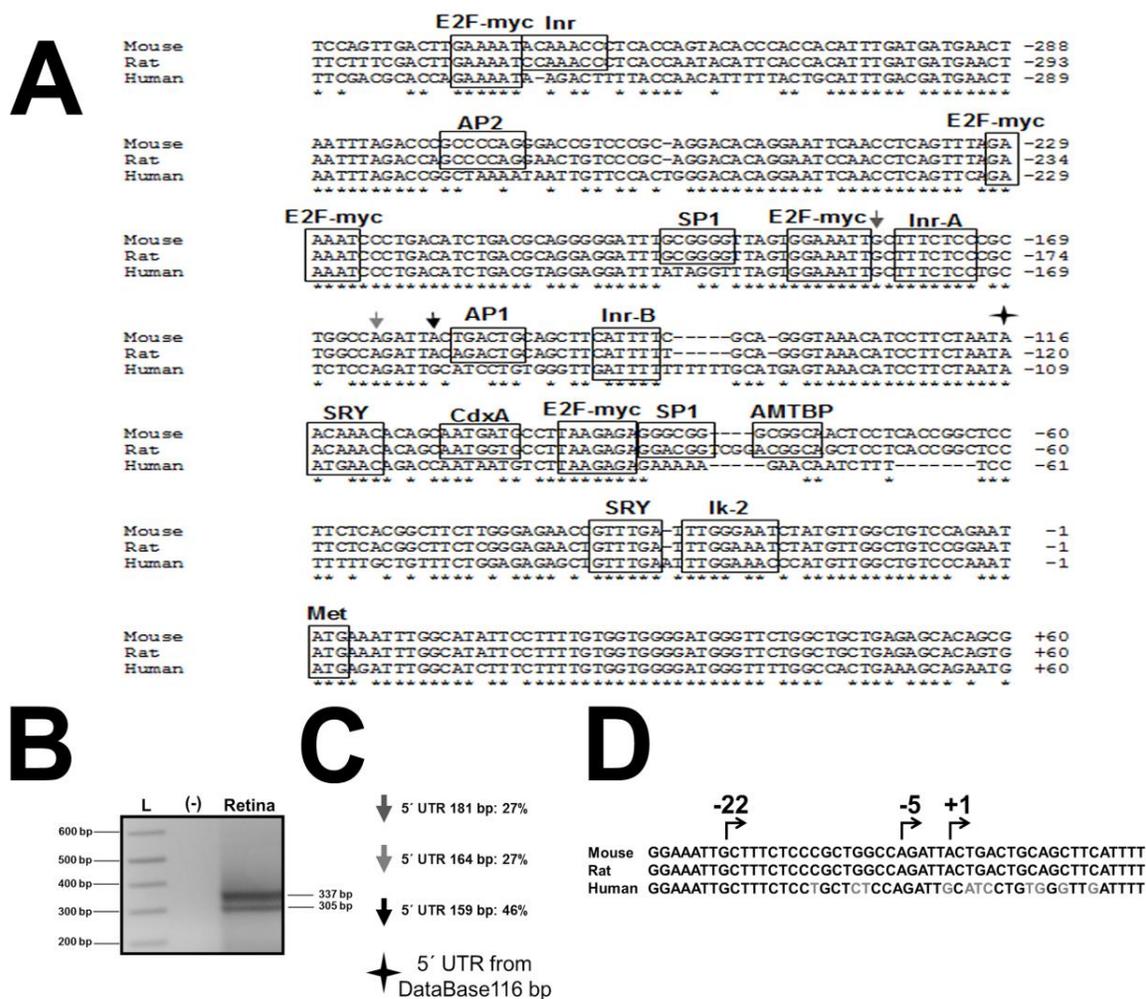


Figura 6. Análisis *in silico* e identificación de los sitios de inicio de la transcripción para el gen *GABA ρ 1*. **A)** Alineamiento de las secuencias que incluyen la región río arriba del gen *GABA ρ 1* en el ratón, humano y rata. Las secuencias fueron alineadas usando el programa ClustalW. Los sitios de inicio de transcripción (TSS) identificados mediante el 5'-RACE están señalados con flechas. El extremo 5' del ADNc de la base de datos del GeneBank está marcado con una estrella. Los sitios SRY, Ik-2, AMTBP, SP1, E2F-myc, CdxA, AP1, AP2 y el elemento Inr están señalados en cuadros. **B)** Los productos de PCR obtenidos mediante el 5'-RACE y aislados de retina se visualizaron en un gel de garosa al 1.2% para su purificación, clonación y secuenciación. **C)** Cuantificación de las regiones 5' no traducibles (UTR's). Tres diferentes UTR's fueron detectados mediante el ensayo 5'-RACE: el fragmento de 181 pb (el cual representa el 27%), el producto de 164 pb (27%) y el de 159 pb (46%). **D)** Identificación del TSS primario del gen *GABA ρ 1* en la secuencia de ratón. El TSS primario (+1) fue asignado para el UTR-5 más abundante (46%), el cual corresponde a una Adenina (A) en el genoma de ratón.

Realizando alineamientos utilizando el programa ECR Browser con más especies de vertebrados como *Mus musculus* (ratón) como la secuencia de referencia, *Homo sapiens* (humano), *Rattus norvegicus* (rata), *Didelphis virginiana* (tlacuache), *Macaca mulatta* (mono rhesus), *Gallus gallus* (gallo), *Pan troglodytes* (chimpancé), *Canis lupus familiaris* (perro), *Xenopus tropicalis* (rana), *Danio rerio* (pez cebra) y *Takifugu rubripes* (fugu), se observó un alto grado de similitud en la región río arriba del gen GABA ρ 1 entre estas especies (Figura 7).

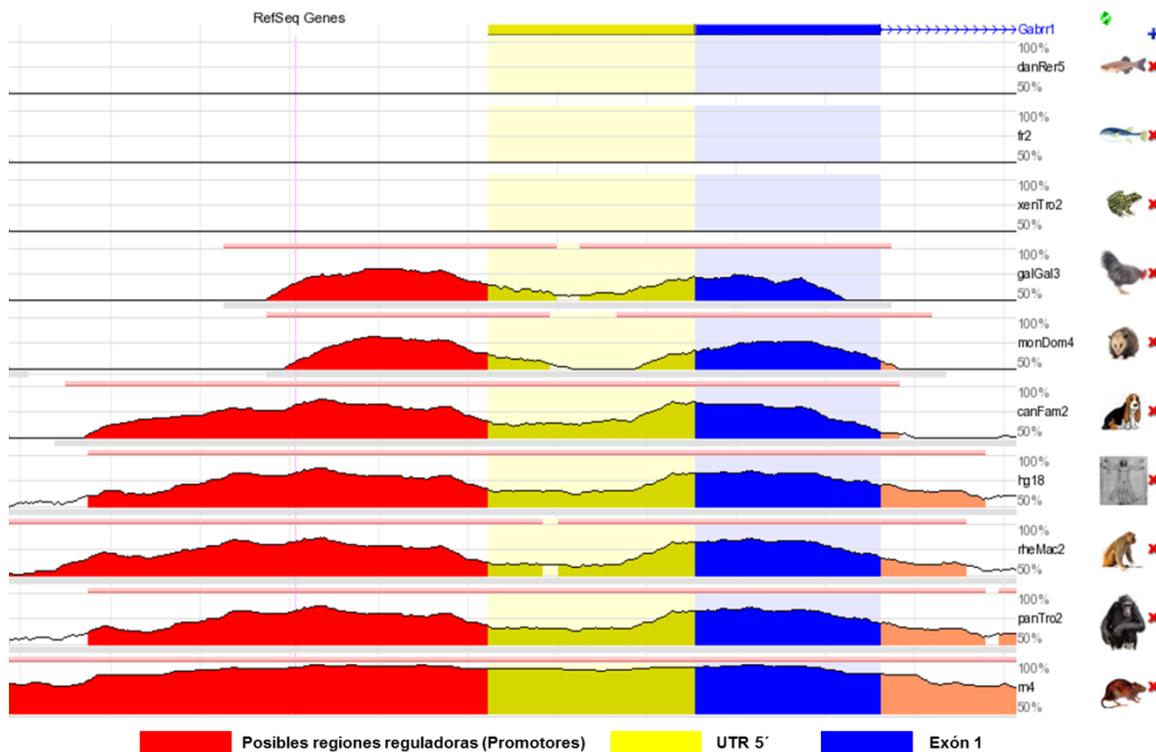


Figura 7. Alineamiento de las secuencias que se ubican 5' de la región codificante del gen GABA ρ 1. El alineamiento de la secuencia de la posible región promotora del gen GABA ρ 1 para diferentes especies. El eje de las y muestra las especies utilizadas para el alineamiento y el porcentaje de similitud: *Mus musculus* (ratón) como la secuencia de referencia, *Homo sapiens* (humano), *Rattus norvegicus* (rata), *Didelphis virginiana* (tlacuache), *Macaca mulatta* (mono rhesus), *Gallus gallus* (gallo), *Pan troglodytes* (chimpancé), *Canis lupus familiaris* (perro), *Xenopus tropicalis* (rana), *Danio rerio* (pez cebra) y *Takifugu rubripes* (fugu). Todas las secuencias mostraron un porcentaje significativo de similitud con la secuencia de ratón, a excepción de la rana, el pez cebra y el fugu. El eje de las x indica las regiones comparadas y alineadas entre las especies marcadas en color. La secuencia codificante en azul, el UTR 5' en amarillo y las posibles secuencias reguladoras en rojo, las cuales comprenden una región de aproximadamente 0.250-kb. Las secuencias se alinearon utilizando el programa ECR Browser.

Llevando a cabo un tercer alineamiento más a detalle con las secuencias de distintos vertebrados como *Mus musculus* (ratón), *Homo sapiens* (humano), *Rattus norvegicus* (rata), *Didelphis virginiana* (tlacuache), *Macaca mulatta* (mono rhesus), *Gallus gallus* (pollo), *Pan troglodytes* (chimpancé), *Canis lupus familiaris* (perro), *Loxodonta africana* (elefante) y *Callithrix jacchus* (tití) para verificar si los posibles sitios de unión a factores de transcripción se conservan, se logró observar que algunos de ellos presentan similitud entre las especies utilizadas para el alineamiento, principalmente los sitios CRE, SP1, AP1, SRY y los dos elementos Inr. El alineamiento se realizó con el programa ClustalW (Figura 8).

	<u>E2F-myc</u>	<u>CRE</u>
Chimpancé	CTGGGACACAGGAATTCAACCTCAGTTTCAGAAAATCCCTGACATCTGACGTAGGAGGATT	
Humano	CTGGGACACAGGAATTCAACCTCAGTTTCAGAAAATCCCTGACATCTGACGTAGGAGGATT	
Mono Rhesus	CTGGGACACAGGAATTCAACCTCAGTTTCAGAAAATCCCTGACATCTGACGTAGGAGGATT	
Tití	CTGGGACACAGGAATTCAACCTCAGTTTCAGAAAATCCCTGACATCTGACGTAGGAGGATT	
Elefante	CAGGGATGCAGGAATTCAGCCTCAGTTTCAGAAAATCCCTCACAGCTGACGTAGGAGGATT	
Perro	CAGGAACACAGGACTTCAACCTCAGTTTCAGAAAATCCCTGACATCTGACGTAGGAGGATT	
Tlacuache	-----CCCTGTTTCAGAAAATCCCTGACATCTGACGTAGAGGGATT	
Pollo	TGAGAATACATGAA-----CACTGCT-AGAAAATCCCTGCCATCTGACGTAGAGGGATT	
Rata	C-AGGACACAGGAATCCAACCTCAGTTTTCAGAAAATCCCTGACATCTGACGTAGGAGGATT	
Ratón	C-AGGACACAGGAATTCACCTCAGTTTTCAGAAAATCCCTGACATCTGACGTAGGAGGATT	
	* * * ***** ** ***** ** *****	

	<u>SP1</u>	<u>E2F-myc</u>	<u>Inr-A</u>	<u>AP1</u>	<u>Inr-B</u>
Chimpancé	TATAGGTTTAGTGGAAATTCCTTTCTCC	TGCTCTCCAGATTGCATCCTGTGGGTTGATTT			
Humano	TATAGGTTTAGTGGAAATTCCTTTCTCC	TGCTCTCCAGATTGCATCCTGTGGGTTGATTT			
Mono Rhesus	TATAGGTTTAGTGGAAATTCCTTTCTCC	TGCTCTCCAGATTGCATCCTGTGGGTTGATTT			
Tití	TATAGGTTTAGTGGAAATTCCTTTCTCC	TGCTCTCCAGATTGCATCCTGTGGGTTGATTT			
Elefante	TATAGGTTTAGTGGAAATTCCTTTCTCC	TGCTCTCCAGATTGCATCCTGTGGGTTGATTT			
Perro	TATAGGTTTAGTGGAAATTCCTTTCTCC	TGCTCTCCAGATTGCATCCTGTGGGTTGATTT			
Tlacuache	TATAGGTTTAGTGGAAATTCCTTTCTCC	CACTATCCAGATTGCATCCTGTGGGTTGATTT			
Pollo	TATAGGTTTAGTGGAAATTCCTTTCTCC	CGCTGAGATTGCATCCTGTGGGTTGATTT			
Rata	TGCGGGGTTAGTGGAAATTCCTTTCTCC	CGCTGAGATTGCATCCTGTGGGTTGATTT			
Ratón	TGCGGGGTTAGTGGAAATTCCTTTCTCC	CGCTGAGATTGCATCCTGTGGGTTGATTT			
	* ** ***** ** ***** ** *****				

	<u>FO XK</u>	<u>SRY</u>	<u>CdxA</u>
Chimpancé	-----TTTTTT--GCATGAGTAAACATCCTTCTAAATAATGAACAGACCAATAATGTCTTA		
Humano	-----TTTTTT--GCATGAGTAAACATCCTTCTAAATAATGAACAGACCAATAATGTCTTA		
Mono Rhesus	-----TTTTTT--GCATGAGTAAACATCCTTCTAAATAATGAACAGACCAATAATGTCTTA		
Tití	-----TTTTTT--GCATGAGTAAACATCCTTCTAAATAATGAACAGACCAATAATGTCTTA		
Elefante	-----TTTTTTTTTCATGAGTAAACATCCTTCTAGTAATGAATAGACCAATAATGTCTTA		
Perro	ATTTATTTTTTT--GCATGAGTAAACATCCTTGGAAATAATGAACAGACCAATAATGTCTTA		
Tlacuache	-----TTTTTTT--GCATGGGTAAACACCCCTTCTAAATAATGAACAGACCAATAACGTCTTG		
Pollo	-----TTT---GTATGAGTAAACATCCTTCCAATAACGATCAGACCGATAATGTCTTA		
Rata	-----TT---GCA--GGTAAACATCCTTCTAAATAACAAACACAGCAATGGTGCCTTA		
Ratón	-----TC---GCA--GGTAAACATCCTTCTAAATAACAAACACAGCAATGGTGCCTTA		
	* ** ***** ***** * ** * * * * * * * * * * * * * * *		

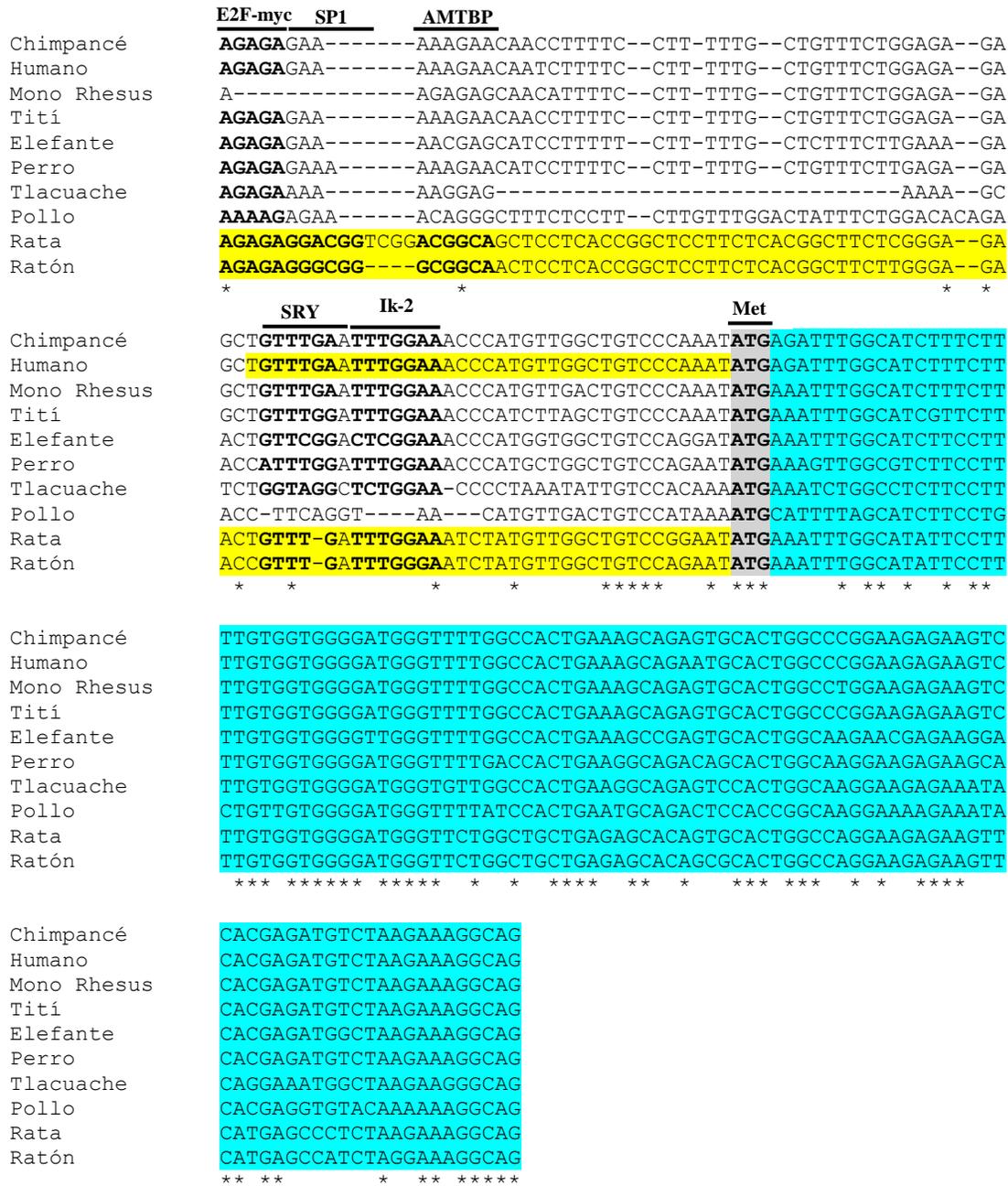


Figura 8. Alineamiento de los posibles promotores del gen GABA ρ 1 en distintos vertebrados. Alineamiento de las regiones flanqueantes 5' del gen GABA ρ 1 utilizando las secuencias del *Mus musculus* (ratón), *Homo sapiens* (humano), *Rattus norvegicus* (rata), *Didelphis virginiana* (tlacuache), *Macaca mulatta* (mono rhesus), *Gallus gallus* (pollo), *Pan troglodytes* (chimpancé), *Canis lupus familiaris* (perro), *Loxodonta africana* (elefante) y *Callithrix jacchus* (tití). Todas las secuencias fueron alineadas con el programa ClustalW. Los sitios de inicio de transcripción (TSS) identificados para el ratón mediante el RACE-5' están señalados en verde. Dos de los TSS están conservados en las especies analizadas. La secuencia codificante está marcada en azul y el primer codón (ATG) en gris. El extremo 5' del ADNc del gen GABA ρ 1 de la rata, humano y ratón están resaltados en amarillo. Los sitios de unión a factores de transcripción en negritas.

Identificación de la región mínima promotora del gen GABA ρ 1 en células STC-1

Para detectar el mínimo promotor del gen GABA ρ 1, se utilizó el sistema reportero de luciferasa para analizar la habilidad de siete construcciones de dirigir la expresión del gen reportero en cuatro líneas celulares: STC-1, GT1-7, 3T3 y HEK. Como punto de partida, se estandarizó la transfección en la línea celular STC-1 con 1 μ g de ADN plasmídico (Figura 9A), en este caso, el plásmido pEGFP-N1, el cual codifica para la proteína GFP y 4.5 μ l of Lipofectamina 2000 (Invitrogen); además, se extrajo ARNtotal de estas células y se confirmó mediante RT-PCR la presencia del transcrito que codifica para el ARNm GABA ρ 1 (Figuras 9B y 9C).

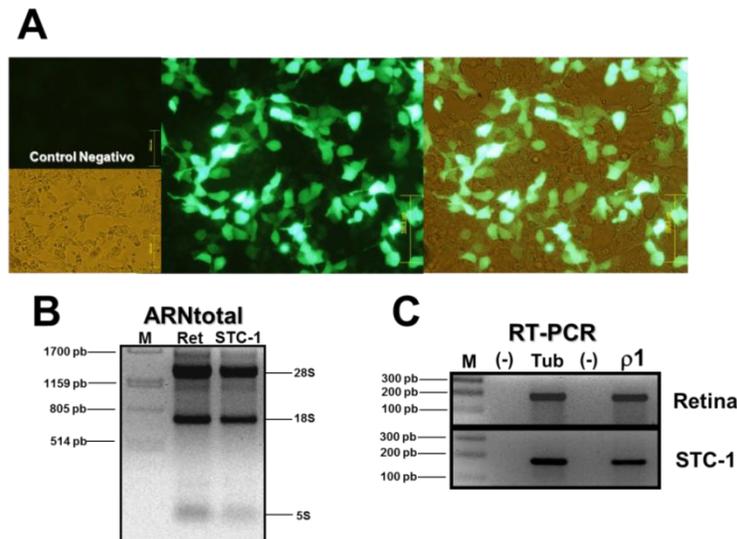


Figura 9. Expresión de la subunidad ρ 1 en células STC-1. A) Transfección de la línea celular STC-1 con el plásmido pEGFP-N1. Control negativo de la transfección de las células en campo oscuro y campo claro (panel izquierdo) y células STC-1 transfectadas expresando la proteína GFP (panel derecho). B) Extracción de ARN total de Retina de ratón y células STC-1 en un gel de agarosa al 1% en los carriles 2 y 3 respectivamente, en el carril 1 el marcador de peso molecular λ *Pst*. C) RT-PCR de la subunidad ρ 1 en células STC-1 observando un producto de 174 pb en el panel inferior (carril 5), en el panel superior la amplificación de la subunidad ρ 1 en Retina como control (carril 5), el control positivo Tubulina para Retina y células STC-1 (carril 3), los controles negativos en los carriles 2 y 4 y el marcador de peso molecular GeneRuler en el carril 1 en un gel de agarosa al 2%.

Posteriormente, se aisló mediante PCR el fragmento de 3-kb que se localiza 5' de la secuencia codificante del gen GABA ρ 1 y seis deleciones seriales obtenidas también mediante PCR (Figura 10). Después, las células STC-1 fueron co-transfectadas con 100 ng del plásmido pRL-CMV (Promega), el cual contiene el promotor CMV dirigiendo la expresión de la luciferasa de Renilla y permitió normalizar la eficiencia de transfección. Usando la línea celular STC-1, la cual expresa de manera endógena el ARNm del gen GABA ρ 1 (Jansen *et al.*, 2000), las construcciones de 3-kb, 2-kb, 1-kb y 1-kb Δ 506-pb mostraron un 26% \pm 4.60%, 34% \pm 4.02%, 55% \pm 4.10% y 60% \pm 3.41% de actividad respectivamente, comparados con el control positivo, (el promotor SV40, el cual se incluyó como referencia para comparar la fuerza del promotor).

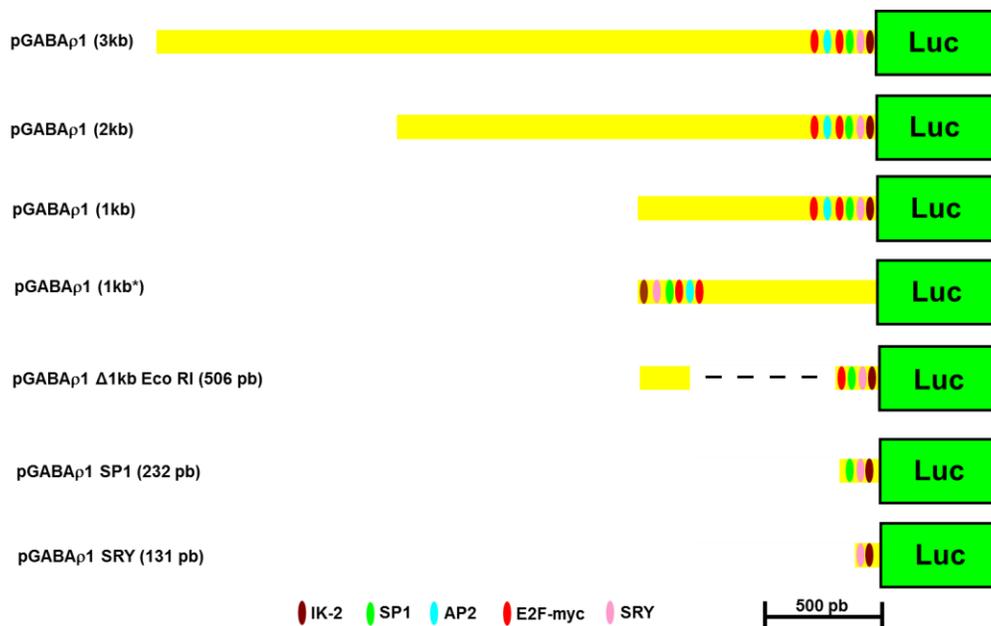


Figura 10. Deleciones seriales de la región 5' del gen GABA ρ 1. Esquema de las 7 construcciones del promotor GABA ρ 1 transfectadas en la línea celular STC-1. Las posiciones de los posibles sitios de unión de factores de transcripción se muestran en cada construcción.

El fragmento de 1-kb con la orientación invertida (1-kb*) mostró solo un $8\% \pm 1.37\%$ de actividad, sugiriendo que su actividad es dependiente de la orientación. La región promotora mínima, la construcción de 0.232-kb que contiene todos los potenciales TSS y los posibles sitios de unión a factores de transcripción, presentó los niveles más altos de actividad ($161\% \pm 6.44\%$). La construcción de 0.131-kb mostró únicamente actividad basal comparada con el control negativo ($8\% \pm 1.22\%$). El vector pGL3-basic (pGL-BV, Promega) fue el control negativo y mostró un $9 \pm 1.69\%$ de actividad (Figura 11).

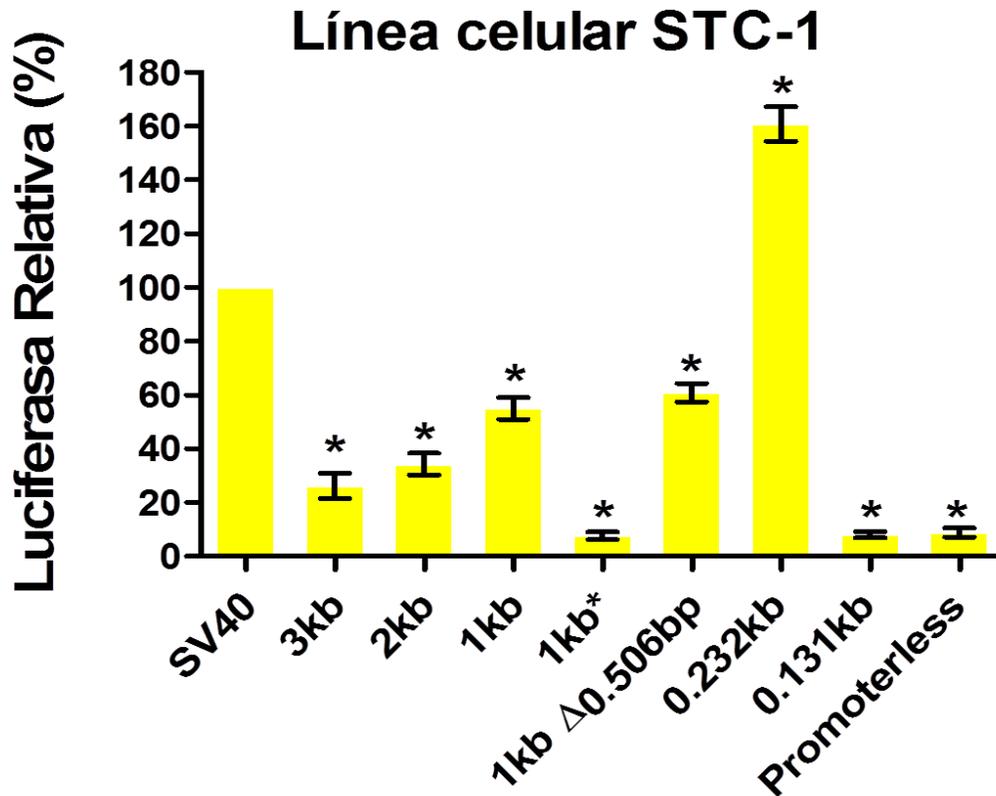


Figura 11. Identificación de la mínima región promotora del gen GABAp1 de ratón en células STC-1. Análisis funcional del promotor del receptor GABAp1 en la línea celular de intestino de ratón STC-1. En cada barra se muestra la media y el error estándar de la activación de la transcripción en 12 ensayos independientes por duplicado de la expresión de luciferasa cuantificada. $P < 0.05$ (U de Mann-Whitney U).

En el caso de la línea celular GT1-7 (Figura 12), la cual es de origen neuronal, las construcciones de 3-kb, 2-kb, 1-kb y 1-kb Δ 506-pb mostraron un $19\% \pm 2.34\%$, $27\% \pm 3.30\%$, $38\% \pm 4.71\%$ y $47\% \pm 4.24\%$ de actividad respectivamente, comparados con el control positivo. La construcción 1-kb* mostró un $7\% \pm 1.62\%$ de actividad. La construcción de 0.232-kb presentó de nuevo los niveles más altos ($129\% \pm 6.86\%$). La construcción de 0.131-kb y el control negativo tuvieron valores basales ($10\% \pm 2.20\%$ y $14 \pm 2.34\%$, respectivamente).

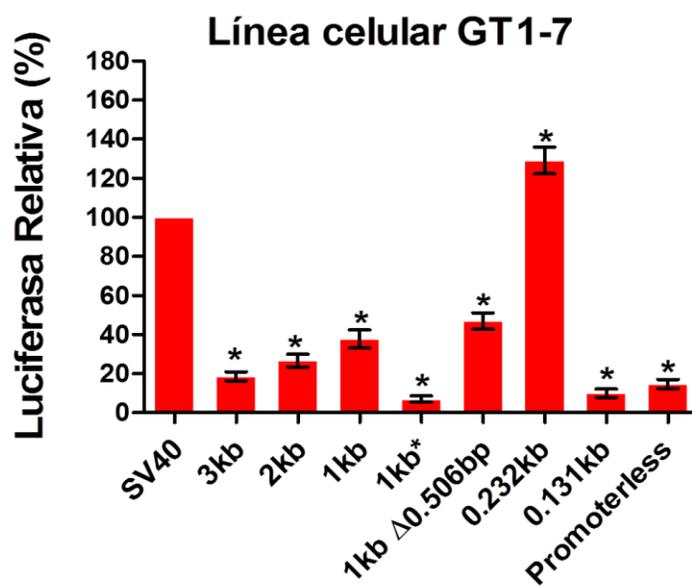


Figura 12. Identificación de la mínima región promotora del gen GABA ρ 1 de ratón en células GT1-7. Análisis funcional del promotor del receptor GABA ρ 1 en la línea neuronal GT1-7. En cada barra se muestra la media y el error estándar de 7 ensayos independientes por duplicado de la expresión de luciferasa. $P < 0.05$ (U de Mann-Whitney U).

Cuando estas mismas construcciones fueron transfectadas en las líneas celulares 3T3 y HEK 293 (Figuras 13 y 14, respectivamente), se observó la misma tendencia, es decir, remociones seriales de la región 5' incrementaron la actividad transcripcional y el fragmento de 0.232-kb mostró los valores más altos de actividad, indicando que este corresponde al promotor mínimo; los niveles de actividad de las construcciones de 1-kb* y

0.131-kb no fueron diferentes de manera significativa con respecto al plásmido pGL-BV (control negativo).

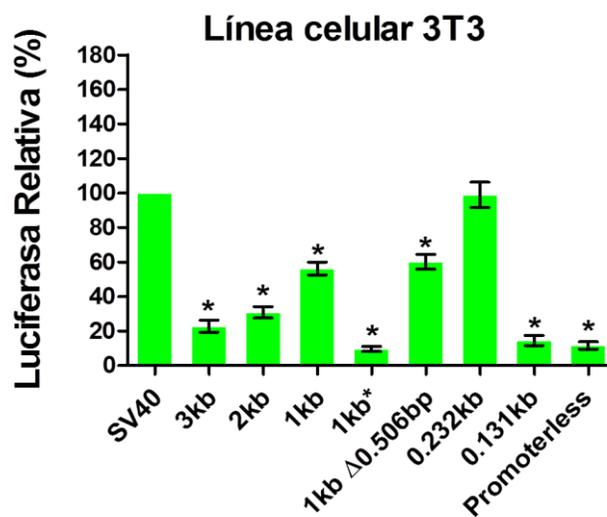


Figura 13. Identificación de la mínima región promotora del gen GABA ρ 1 de ratón en células 3T3. Análisis funcional del promotor del receptor GABA ρ 1 en la línea 3T3. En cada barra se muestra la media y el error estándar de 9 ensayos independientes por duplicado de la actividad del gen reportero luciferasa. $P < 0.05$ (U de Mann-Whitney U).

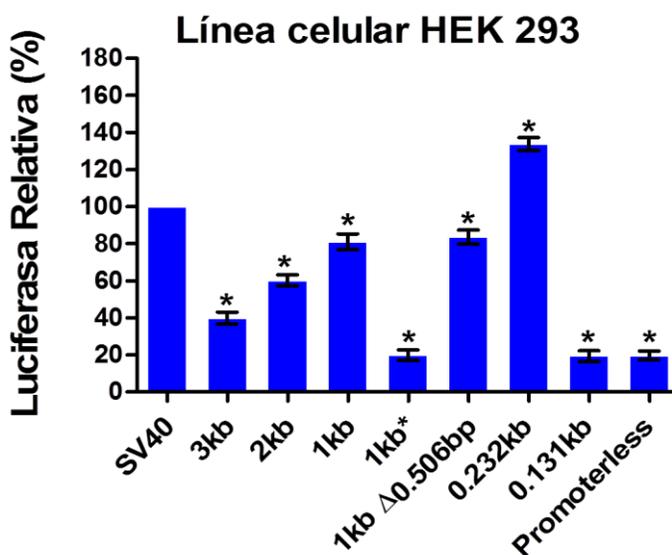


Figura 14. Identificación de la mínima región promotora del gen GABA ρ 1 de ratón en la línea celular HEK293. Análisis funcional del promotor del receptor GABA ρ 1 en células HEK293. En cada barra se observa la media y el error estándar de 7 ensayos independientes por duplicado de la expresión del gen reportero luciferasa. $P < 0.05$ (U de Mann-Whitney U).

Estos resultados indican que la región promotora mínima para dirigir la expresión del gen GABA ρ 1 está ubicada dentro del fragmento de 0.232-kb, la cual incluye todos los elementos requeridos para activar la transcripción en células STC-1 y en las diferentes líneas celulares transfectadas.

Los elementos *cis*-reguladores requeridos para la actividad del promotor de 0.232-kb en células STC-1

Para determinar los elementos *cis*-reguladores que son críticos para la actividad del promotor de 0.232-kb del gen GABA ρ 1, se generaron mutantes con deleciones internas y se probó su actividad para dirigir la transcripción en células STC-1. Los sitios de unión a factores de transcripción removidos fueron SP1, Inr-A, AP1, Inr-B y SRY (Figura 15).

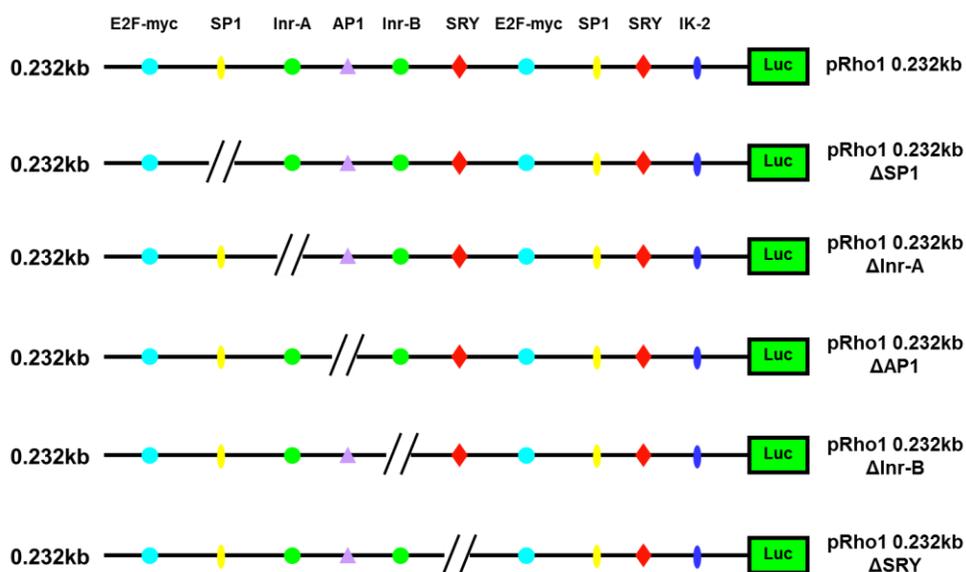


Figura 15. Deleciones de los elementos *cis*-reguladores en el promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb. Ilustración esquemática del promotor GABA ρ 1 con las deleciones de los posibles sitios de unión a factores de transcripción. Se muestran las posiciones de corte para cada uno de los posibles sitios de unión a factores de transcripción.

Las construcciones con los sitios SP1, Inr-A y SRY deletados no mostraron diferencia significativa con respecto al fragmento de 0.232-kb. Por otro lado, la deleciones de los sitios AP1 y el segundo Inr (Inr-B) redujeron sus niveles de actividad como promotores un $47\% \pm 3.46\%$ y $59\% \pm 2.90\%$, respectivamente (Figura 16).

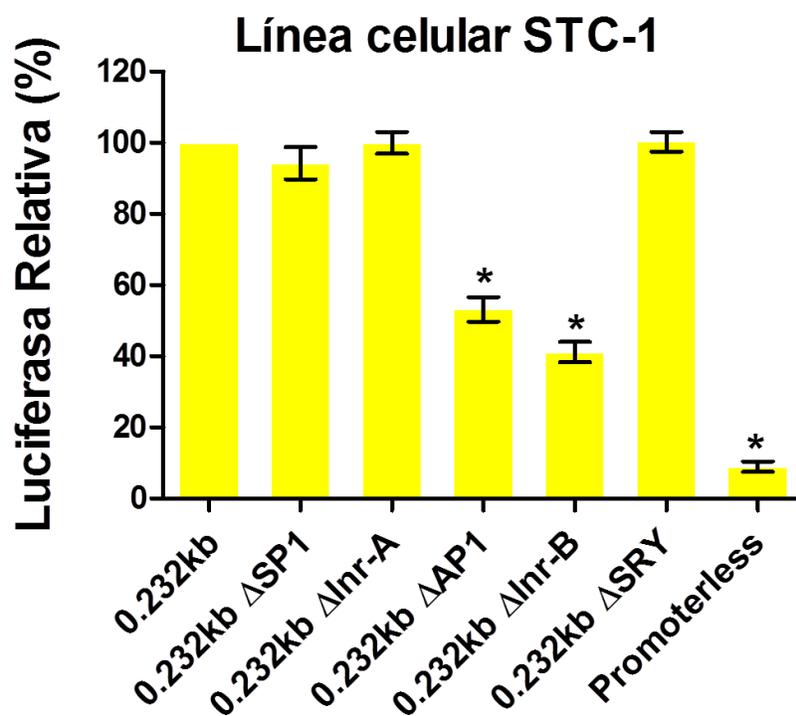


Figura 16. Determinación de los elementos *cis*-reguladores críticos para la actividad del promotor $GABA\rho 1$ de 0.232-kb en células STC-1. Análisis del gen reportero luciferasa utilizando las construcciones que contienen las deleciones de los posibles sitios de unión a factores de transcripción del promotor $GABA\rho 1$ de 0.232-kb en células STC-1 transfectadas. En cada barra se observa la media y el error estándar de 5 ensayos independientes por duplicado. $P < 0.05$ (U de Mann-Whitney U).

Para confirmar que los sitios de unión AP1 e Inr-B realmente contribuyen a la actividad del promotor $GABA\rho 1$, se generaron mutantes con cambios puntuales de nucleótidos para ambos sitios, como se muestra en la figura 17.

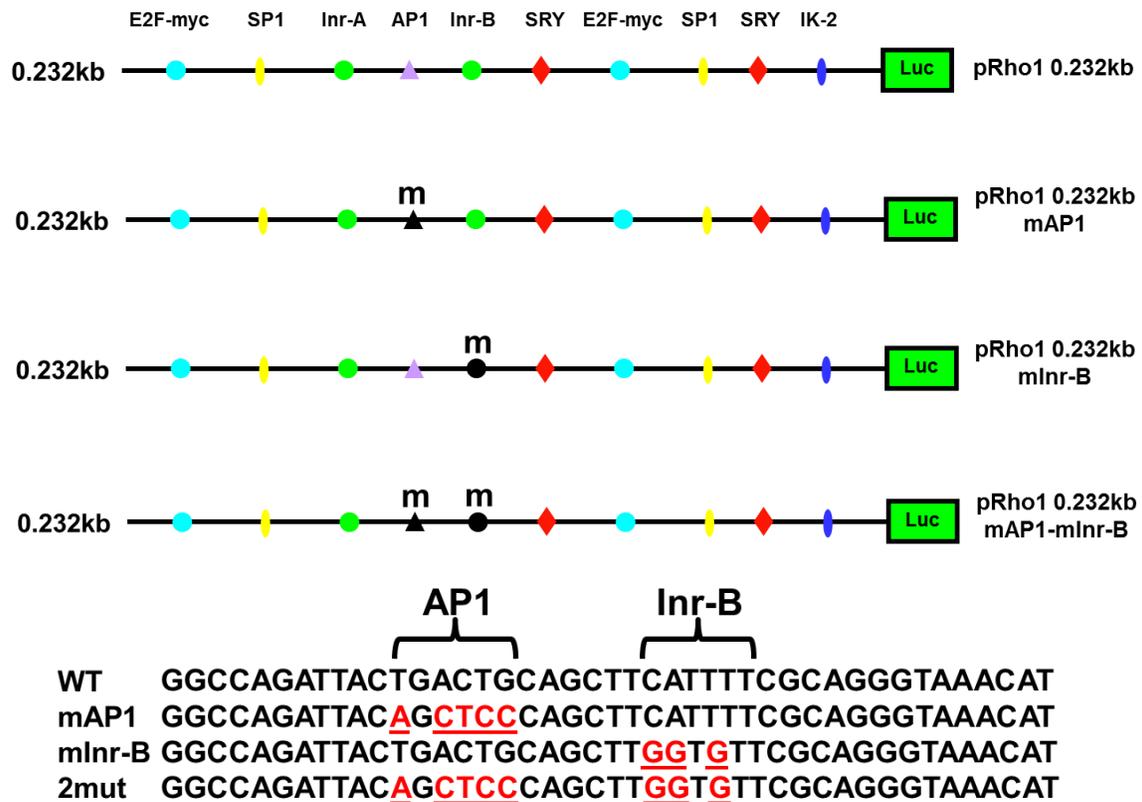


Figura 17. Mutaciones de los elementos *cis*-reguladores necesarios para la actividad del promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb. Ilustración esquemática del promotor GABA ρ 1 con las mutaciones de los posibles sitios de unión a factores de transcripción. Se muestran las posiciones de las mutaciones y el cambio nucleotídico para cada uno de los posibles sitios de unión a factores de transcripción.

La mutante del sitio AP1 presentó un decremento en la actividad de un $44\% \pm 3.92\%$, mientras que la mutación del Inr-B redujo su actividad un $55\% \pm 3.43\%$. Cabe destacar que cuando ambos sitios fueron mutados, los niveles de actividad se redujeron hasta un $85\% \pm 3.38\%$ (Figura 18). Estos datos fuertemente sugieren que los sitios Inr-B y AP1 son importantes para la actividad del promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb en células STC-transfectadas.

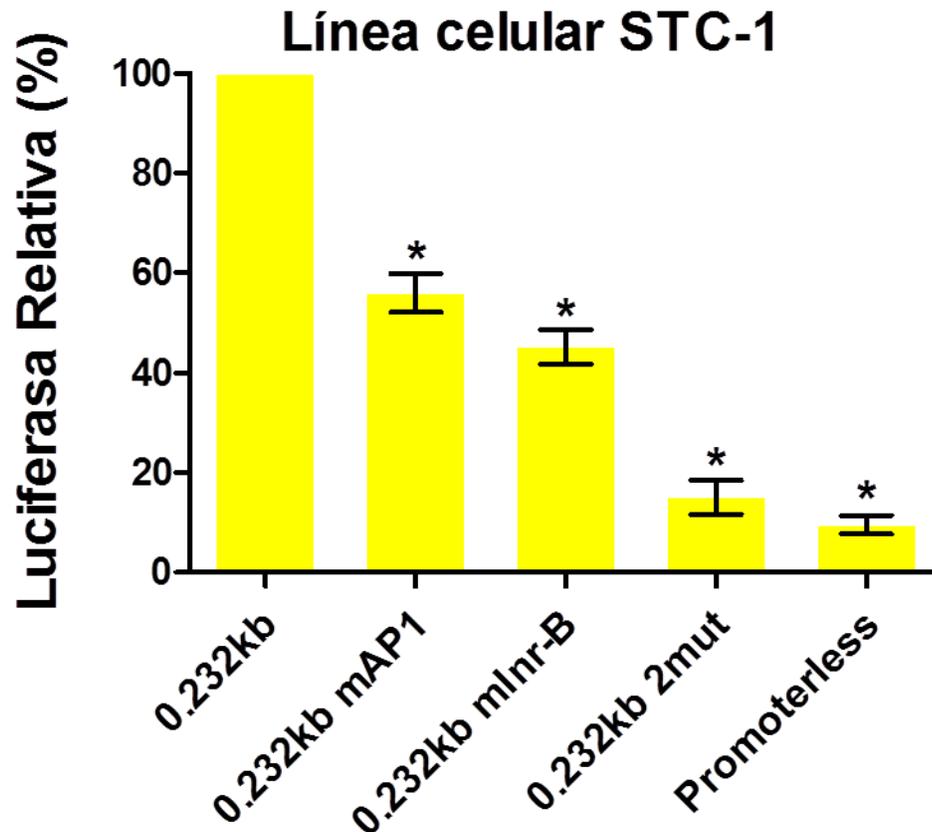


Figura 18. Actividad del promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb incluyendo las mutaciones de los posibles sitios de unión a factores de transcripción. Ensayos con el gen reportero luciferasa en células STC-1 transfectadas con el promotor silvestre GABA ρ 1 de 0.232-kb y las versiones que incluyen las mutaciones. En cada barra se observa la media y el error estándar de 5 ensayos independientes por duplicado. $P < 0.05$ (U de Mann-Whitney U).

La electroporación *in vitro* no modifica los niveles endógenos de expresión del ARNm del gen GABA ρ 1 en explantes de retina

Para explorar la actividad del promotor GABA ρ 1 en retina de ratón se llevaron a cabo RT-PCR cuantitativas para determinar si el proceso de electroporación modifica los niveles de expresión endógena del ARNm del gen GABA ρ 1 en explantes de retina (Figura 19). Se cultivaron retinas de ratón durante 10 días después de la electroporación; los grupos experimentales incluyeron retinas no electroporadas (B), retinas electroporadas con PBS

1X (C) y retinas electroporadas con el vector CAG-GFP en PBS 1X (D). Retinas de ratón P10 fueron usadas como control (A). Los genes de Actina y RplP0 fueron usados para normalizar los valores. No observamos diferencia significativa entre los grupos (ANOVA de una vía $p < 0.05$), por lo que estos resultados sugieren que la electroporación *in vitro* no altera los niveles endógenos del ARNm del gen GABA ρ 1.

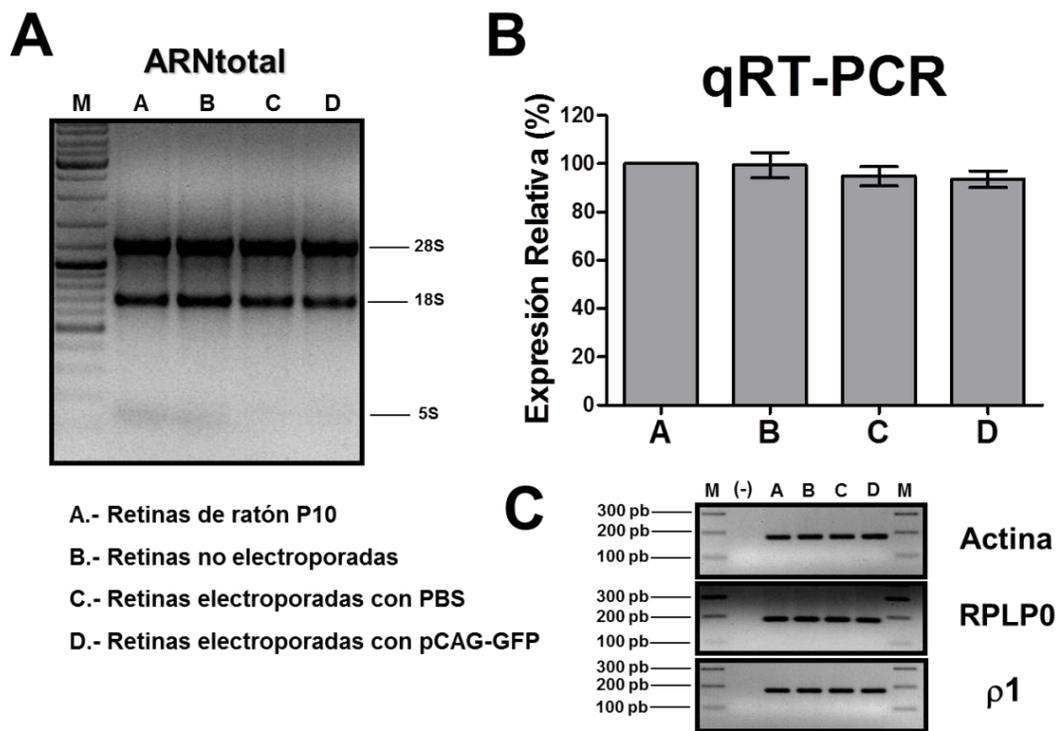


Figura 19. La electroporación *in vitro* no modifica los niveles de expresión endógena del ARNm del gen GABA ρ 1 en explantes de retina. A) Gel de agarosa al 1.2% mostrando el ARNtotal extraído de las retinas electroporadas *in vitro*. B) representa retinas de ratón P0 cultivadas no electroporadas; C muestra retinas de ratón P0 electroporadas únicamente con PBS; D indica retinas de ratón P0 electroporadas con el plásmido CAG-GFP y A representa retinas de ratón P10 como control; M es el marcador de peso molecular. B) qRT-PCR de los niveles de expresión del ARNm del gen GABA ρ 1 en explantes de retina cultivados durante 10 días. La expresión relativa del ARNm del gen GABA ρ 1 fue normalizada usando dos genes constitutivos: Actina y RplP0 (n=5). C) Los productos de la qRT-PCR se muestran en un gel de agarosa al 2%. $P < 0.05$ (ANOVA de una vía y la prueba de Tukey).

Actividad del promotor GABA ρ 1 en retina

Para determinar si el promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb activa transcripción en retina, se electroporaron *in vitro* retinas de ratón P0 con algunas de las delecciones seriales 5' del promotor GABA ρ 1 utilizadas en los experimentos previos (2-kb, 1-kb, 1-kb* y 0.232-kb) y se prepararon los extractos correspondientes para medir la actividad del gen reportero luciferasa después de diez días en cultivo (Figura 20).



Figura 20. Delecciones seriales de la región 5' del gen GABA ρ 1. Esquema de las 4 construcciones del promotor GABA ρ 1 electroporadas *in vitro* en retinas de ratón. Las posiciones de los posibles sitios de unión de factores de transcripción se muestran en cada construcción.

Los ensayos de luciferasa mostraron que los fragmentos de 2-kb y 1-kb activan transcripción en retina con niveles parecidos a los del promotor SV40, utilizado como control positivo en estos ensayos ($102\% \pm 16.23\%$ and $128\% \pm 19.26\%$, respectivamente); los niveles observados con el fragmento 1-kb* y con el control negativo pGL-BV fueron $20\% \pm 2.33\%$ y $11\% \pm 3.07\%$, respectivamente. En contraste, el fragmento de 0.232-kb

mostró los niveles más altos de actividad transcripcional, un incremento de $500\% \pm 16.50\%$ relativo al control positivo SV40 (Figura 21).

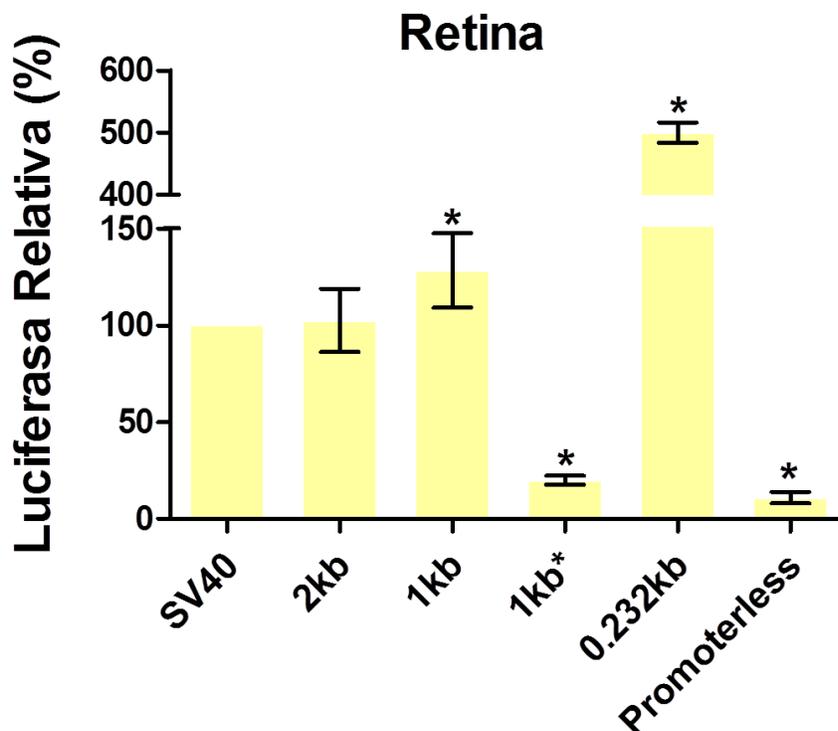


Figura 21. Identificación de la región promotora del gen GABA ρ 1 en retina de ratón. Actividad del promotor GABA ρ 1 dirigiendo la expresión del gen reportero luciferasa en retinas electroporadas *in vitro* de ratón P0. En cada barra se observa la media y el error estándar de la activación de la transcripción en 4 ensayos independientes por duplicado. $P < 0.05$ (U de Mann-Whitney U).

Para validar los elementos *cis*-reguladores que son críticos para la actividad del promotor GABA ρ 1 en células STC-1 transfectadas, se electroporaron *in vitro* retinas de ratón P0 con las mutantes que incluyen las deleciones internas y se determinó su actividad para dirigir la transcripción en explantes de retina. Los sitios de unión a factores de transcripción SP1, Inr-A y SRY mostraron los mismos niveles de actividad con respecto al promotor silvestre de 0.232-kb. Por otro lado, la deleción del sitio AP1 redujo la actividad del promotor un $56\% \pm 6.91\%$, mientras que el segundo Inr (Inr-B) presentó un decremento del $48\% \pm 6.69\%$ (Figura 22).

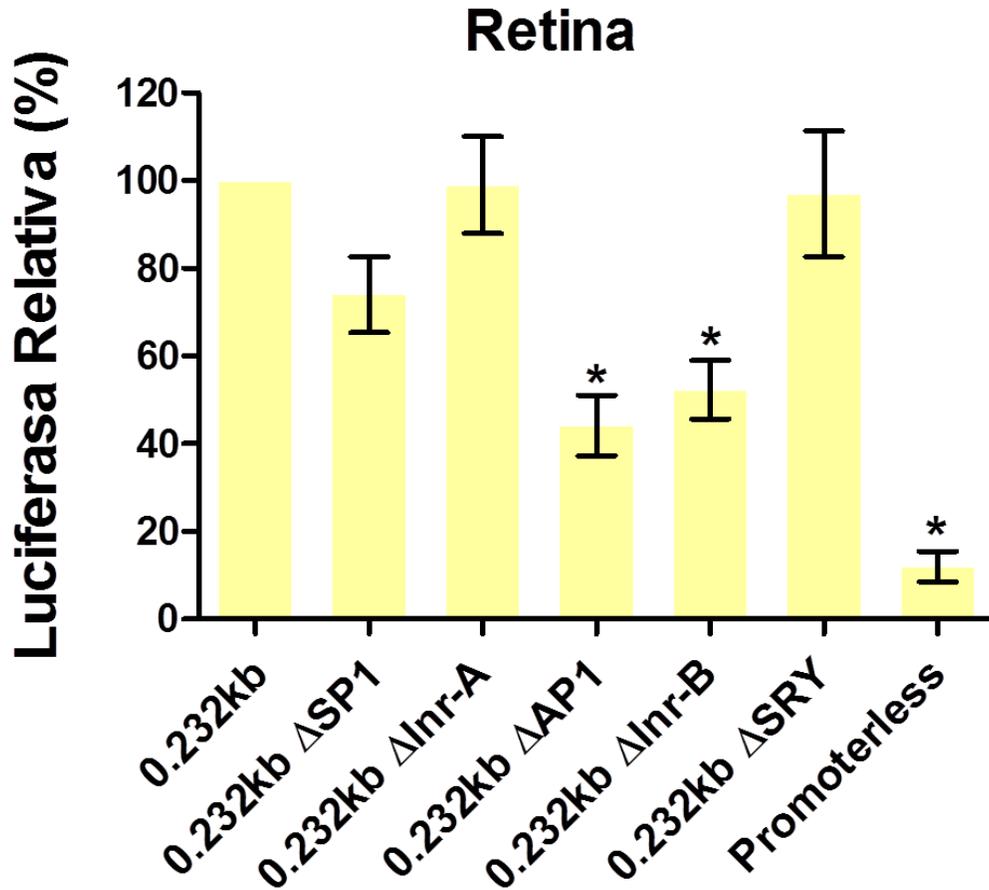


Figura 22. Elementos *cis*-reguladores requeridos para la actividad del promotor GABA ρ 1 en retina. Actividad del promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb en retinas de ratón P0 electroporadas *in vitro*. En cada barra se muestra la media y el error estándar de 4 ensayos independientes por duplicado de la actividad del gen reportero luciferasa. $P < 0.05$ (U de Mann-Whitney U).

Para probar si los posibles elementos *cis*-reguladores (AP1 e Inr-B) eran esenciales para la actividad del promotor GABA ρ 1, se electroporaron retinas con el fragmento de 0.232-kb y las versiones que contienen las mutaciones puntuales. La mutación del sitio AP1 presentó un decremento del $43\% \pm 8.77\%$ de actividad, mientras que la mutación Inr-B un decremento de $41\% \pm 9.53\%$. Los niveles de actividad transcripcional se redujeron hasta un $59\% \pm 6.12\%$ cuando ambos sitios se mutaron (Figura 23).

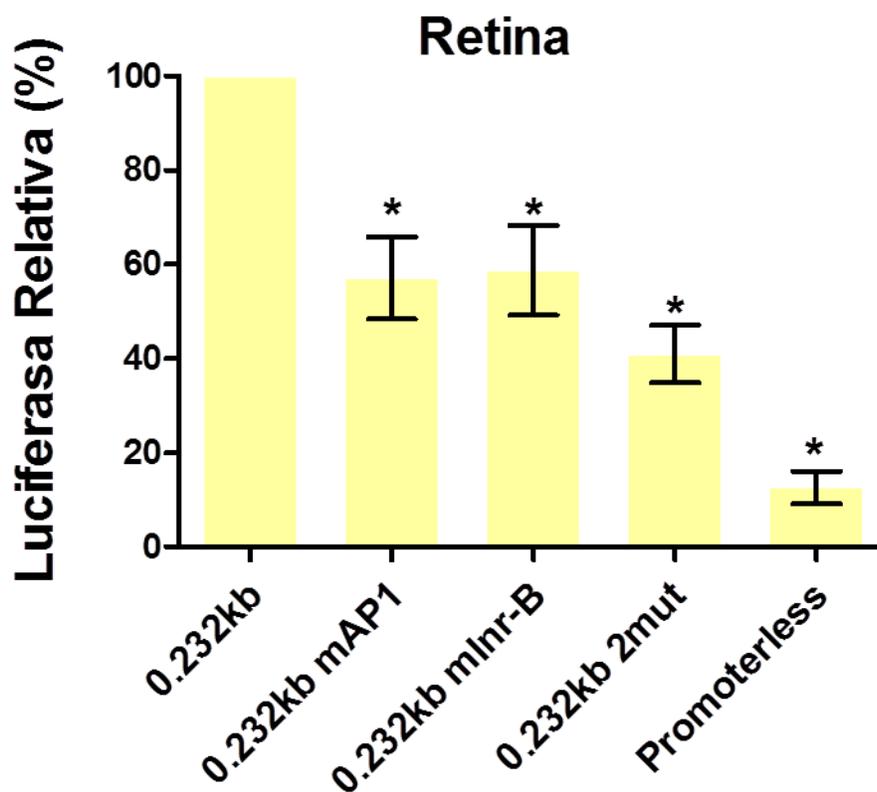


Figura 23. Actividad del promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb incluyendo las mutaciones de los posibles sitios de unión a factores de transcripción en retina. Ensayos con el gen reportero luciferasa utilizando explantes de retina con el promotor silvestre GABA ρ 1 de 0.232-kb y las construcciones que incluyen las mutaciones. En cada barra se observa la media y el error estándar de 4 ensayos independientes por duplicado. $P < 0.05$ (U de Mann-Whitney U).

Para definir la capa celular de la retina en la que el promotor GABA ρ 1 activa la transcripción, se detectó mediante inmunofluorescencia su actividad después de la electroporación *in vitro* de explantes de retina de usando los fragmentos de 0.232-kb y 0.232-kb con la orientación invertida dirigiendo la expresión de GFP (Figura 24).

El promotor CAG se utilizó como control positivo y activó transcripción en todas las capas celulares de la retina. El fragmento de 0.232-kb disparó la transcripción en la capa nuclear interna (INL) y en la capa de células ganglionares (GCL), mientras que la versión con el fragmento invertido no activó transcripción en ninguna de las capas de la retina, sugiriendo que esta región es dependiente de la orientación. Una construcción sin promotor fue usada como control negativo (Figura 24).

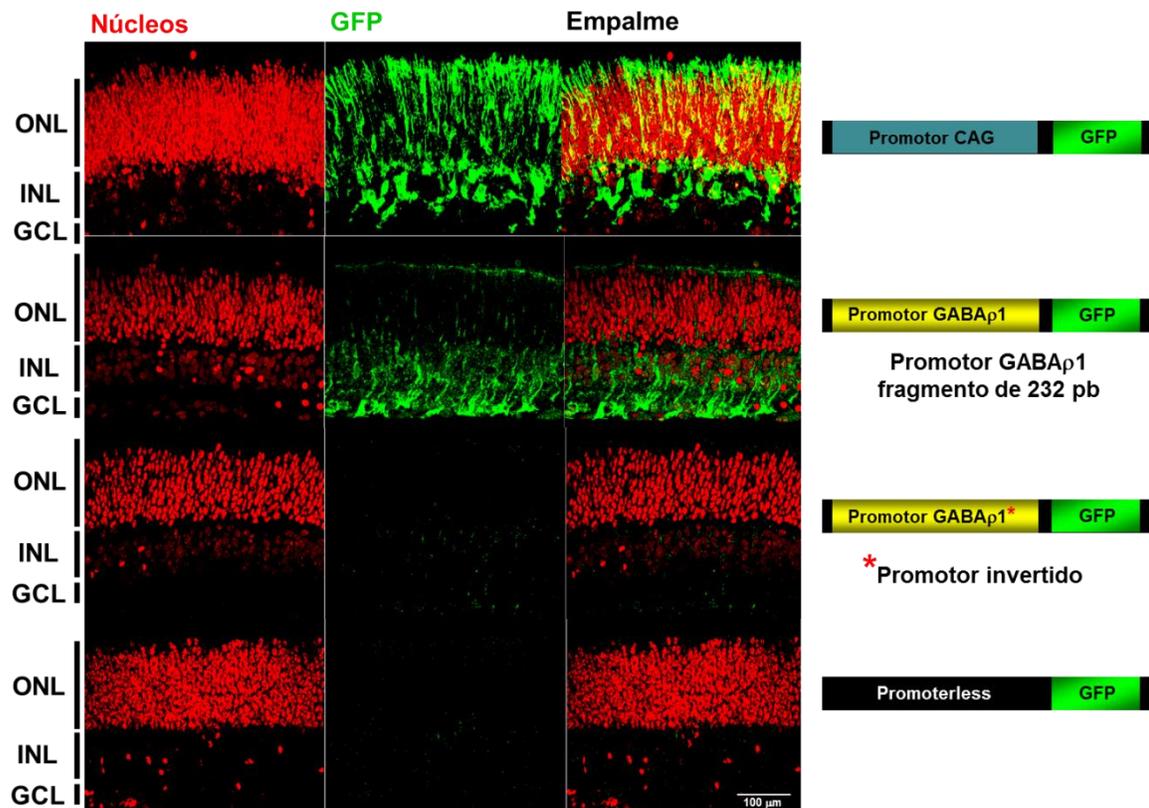


Figura 24. El promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb activa transcripción en la capa nuclear interna de la retina. Inmunofluorescencias de explantes de retina de ratón P0 electroporados *in vitro* y cultivados durante 12 días con diferentes vectores que codifican para el gen reportero GFP (en verde). El promotor CAG se utilizó como control, el cual activa transcripción en todas las capas de la retina (ONL, capa nuclear externa; INL, capa nuclear interna; GCL, capa de células ganglionares). La actividad del promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb disparó la transcripción en la INL y en la GCL. Como se esperaba, el promotor GABA ρ 1 invertido no activó transcripción en las células de la retina. Un vector sin promotor fue utilizado como control negativo. Ioduro de propidio fue usado para teñir los núcleos de las células (en rojo). Escala, 100 μ m.

Para verificar si la expresión de GFP estaba presente en las neuronas bipolares tipo ON, se prepararon dobles inmunofluorescencias con el anticuerpo anti- $\text{PKC}\alpha$, el cual es un marcador de identidad para estas células (Haverkamp *et al.*, 2003); como se esperaba, la señal de GFP colocalizó con el marcador $\text{PKC}\alpha$ (Figura 25). Sin embargo, cuando se hizo lo mismo con un marcador para glía de Müller, la glutamino sintetasa (GS), se observó que la expresión de GFP también localiza en estas células.

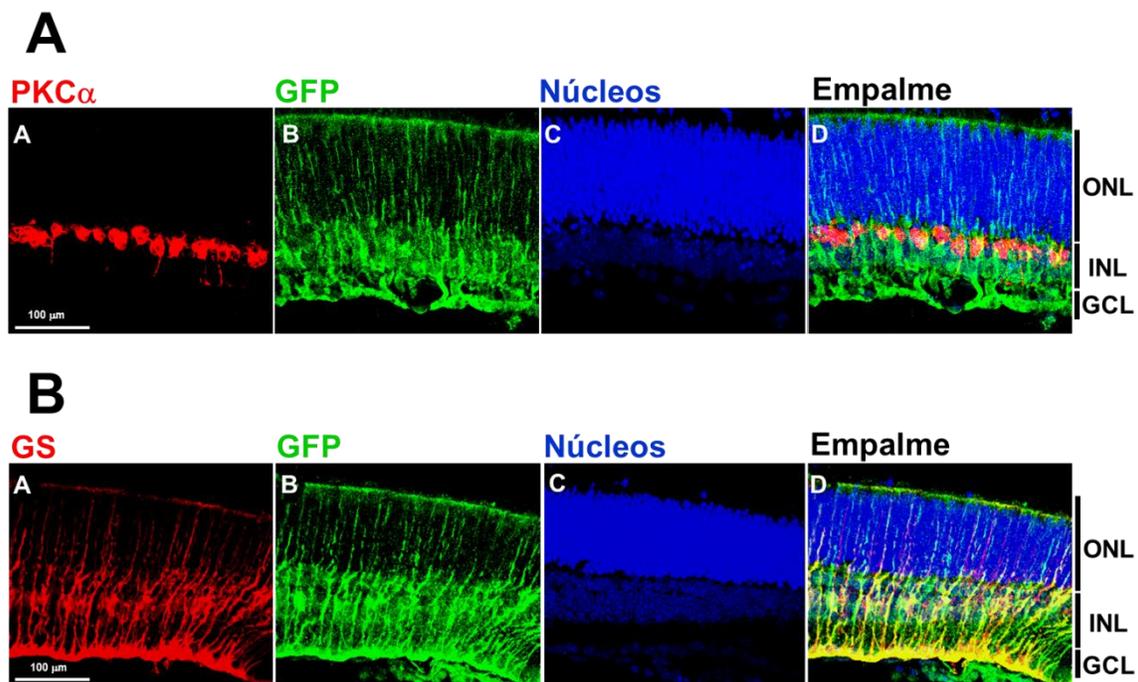


Figura 25. El promotor $\text{GABA}\pi 1$ de 0.232-kb activa transcripción en las neuronas bipolares de retina tipo ON y en la glía de Müller. **A)** La señal de $\text{PKC}\alpha$ es positiva en neuronas bipolares tipo ON (rojo, panel A-A) usando explantes de retina de ratón electroporados *in vitro*. La señal de GFP (verde, panel A-B) colocalizó con $\text{PKC}\alpha$ (panel A-D). **B)** La glía de Müller es inmunorreactiva de manera específica a GS (rojo, panel B-A) y se logra observar que la señal de GFP (verde, panel B-B) colocaliza en este tipo celular (panel B-D). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (en azul, paneles A-C y B-C). Escala 100 μm .

De manera contrastante, cuando se electroporaron rebanadas de cerebelo de ratón P6 con el fragmento de 0.232-kb, no se lograron observar niveles significativos de fluorescencia después de 8 días de cultivo (Figura 26).

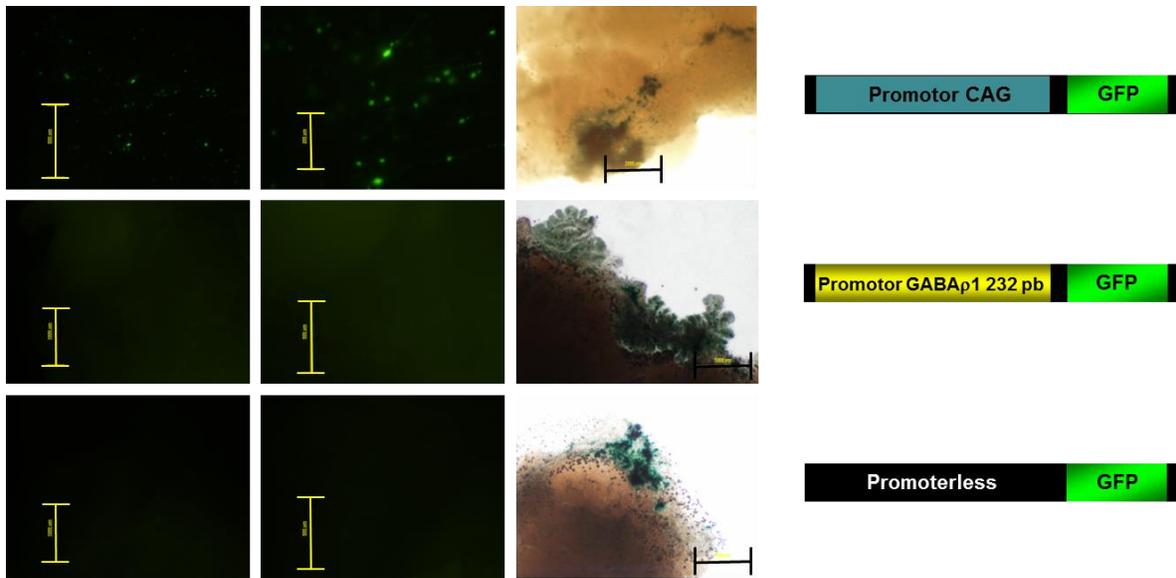


Figura 26. El promotor GABA ρ 1 no activa transcripción en cerebelo. Rebanadas de cerebelo de ratón P6 electroporadas in vitro y cultivadas durante 7 días con diferentes vectores que permiten la expresión de la proteína GFP. El promotor CAG (panel superior) se utilizó como control positivo ya que activa transcripción en las células del cerebelo. El promotor GABA ρ 1 de 0.232-kbno activó transcripción en el cerebelo (panel intermedio). El vector si promotor (promotorless) como control negativo. Todas las rebanadas fueron co-electroporadas con el plásmido CAG β -gal para confirmar la eficiencia de electroporación de la técnica en diferentes zonas del tejido. Escala, 1,000 μ m y 500 μ m.

Todos estos resultados indican que el promotor GABA ρ 1 de 0.232-kb pueden activar de manera específica la transcripción en la INL de la retina, donde las neuronas bipolares de tipo ON están presentes; nuestros resultados también indican que este fragmento es dependiente de la orientación y que los sitios AP1e Inr-B son requeridos para la actividad adecuada del promotor GABA ρ 1 en retina de ratón y en células STC-1 transfectadas.

Discusión

En el presente estudio analizamos la mínima región promotora del gen GABA ρ 1. El receptor GABA ρ 1 genera corrientes iónicas rápidas en la terminal axónica de las neuronas bipolares de tipo ON, controlando así la señal de entrada excitatoria a las neuronas ganglionares. El ARNm del gen GABA ρ 1 es altamente expresado en la retina y el receptor se localiza en la terminal de las neuronas bipolares de tipo ON (Enz *et al.*, 1996; Lukasiewicz, 1996; Koulen *et al.*, 1997; Boue-Grabot *et al.*, 1998; Feigenspan y Bormann, 1998; Fletcher *et al.*, 1998; Wässle *et al.*, 1998).

Inicialmente, los análisis *in silico* revelaron que el promotor del gen GABA ρ 1 carece de caja TATA, contiene sitios putativos para algunos factores de transcripción como AP1, AP2, Ik-2, SP1, SRY y E2F-myc, además de dos sitios Inr, los cuales están altamente conservados en el ratón, humano y rata. De hecho, la región flanqueante 5' del gen GABA ρ 1 se conserva de manera significativa entre algunas especies de mamíferos y aves, pero se dispersa al momento de compararse con anfibios y peces (Figura 7).

De manera similar a otros genes, entre ellos los que codifican para algunas subunidades de los receptores GABA $_A$, por ejemplo α 3 humano y ratón (Mu and Burt, 1999), α 5 humano (Kim *et al.*, 1997), α 6 humano (McLean *et al.*, 2000), α 6 de rata (Jones *et al.*, 1996; Bahn *et al.*, 1997), α 6 de ratón (Jones *et al.*, 1996; McLean *et al.*, 2000), β 1 humano (Russek *et al.*, 2000), β 3 humano (Kirkness y Fraser, 1993), γ 2 humano (Mu and Burt, 1999), δ de rata (Motejlek *et al.*, 1994) y δ de ratón (Sommer *et al.*, 1990), el promotor del gen GABA ρ 1 carece de caja TATA y contiene múltiples TSSs.

El TSS más abundante detectado mediante RACE 5' contiene el dinucleótido AC, el cual es un sitio de inicio de transcripción común para los transcritos de la RNA polimerasa II (Breathnach y Chambon, 1981). Los promotores sin caja TATA no son exclusivos de los canales iónicos activados por ligando. Análisis de genomas completos utilizando regiones promotoras han dejado claro que el ensamble del complejo de preiniciación dirigida por la caja TATA es la excepción en la transcripción para eucariotas, ya que solo el 10-20% de los promotores contienen una caja TATA funcional (Carninci *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007).

Los promotores no pueden ser identificados de forma exacta solamente con información proveniente de su secuencia nucleotídica, sin embargo, se pueden clasificar funcionalmente como promotores distales y promotores proximales. Los promotores proximales son los responsables para el correcto posicionamiento del complejo de la RNA polimerasa II con respecto al TSS y su función es mediada por una caja TATA y/o elementos Inr que reclutan la maquinaria transcripcional. Por otro lado, los promotores distales contienen múltiples sitios de unión a factores de transcripción que confieren una mayor especificidad a la transcripción estabilizando el complejo de pre-iniciación (Lemon y Tjian, 2000).

Después de remover la región 5' del promotor GABA ρ 1, se logró observar que el promotor mínimo, un fragmento de 0.232-kb, era suficiente para activar la transcripción en cuatro líneas celulares diferentes, así como en la retina. De hecho, otras subunidades GABA $_A$ tienen promotores mínimos con un tamaño comparable; por ejemplo el gen de la subunidad α 6 en rata una región de 0.155-kb (McLean *et al.*, 2000); el gen que codifica para la subunidad β 1 en humano una región de 0.279-kb (Russek *et al.*, 2000); el gen β 3 en

humano con una mínima región promotora de 0.143-kb (Kirkness y Fraser, 1993). Esto es relevante debido a que se ha sugerido que los genes GABA_A surgieron a partir de un par génico α - β ancestral, el cual dio lugar a las subunidades GABA_A actuales (Tsang *et al.*, 2007). Un modelo basado en la acción selectiva de posibles andamiajes y regiones de unión a la matriz (S/MARs Scaffold/Matrix Attachment Regions) fue propuesto para el control coordinado y expresión en paralelo de las subunidades α 1 y β 2, las cuales están presentes en el grupo de genes del receptor GABA_A en mamíferos que incluye a las subunidades α 1, β 2, γ 2 y α 6 (Joyce, 2007).

Comparable a nuestros resultados, cuando Kuzmanovic *et al.* intentaron identificar las secuencias reguladoras y las regiones necesarias para la expresión del gen de la proteína ácida glial fibrilar (por sus siglas en inglés, GFAP), la cual se expresa en la glía de Müller y en los astrocitos de la retina (Sarchy y Ripps, 2001; Eng y Lee, 1995), observaron que las secuencias 5' proximales (aproximadamente 0.3-kb) del gen activan la transcripción del gen reportero luciferasa en la línea celular de Müller E6/7, en las células C6 y en las 3T3; secuencias distales (>2.5-kb) reprimían la expresión y en las diferentes delecciones seriales de la región 5' mostraron una tendencia muy similar en las células de Müller y en los cultivos de astrocitos (Kuzmanovic *et al.*, 2003).

El promotor mínimo GABA ρ 1 de ratón contiene un elemento Inr crucial, el cual es importante para activar transcripción y se observó que está conservado en las especies de mamíferos que fueron analizadas en este estudio. Estos elementos también están incluidos y son necesarios para la actividad funcional de algunos promotores de las subunidades GABA_A, por ejemplo la subunidad α 5 de rata (Kim *et al.*, 1997); α 6 de humano, rata y

ratón (McLean *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 1996; Bahn *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1996; McLean *et al.*, 2000), $\beta 1$ en humano (Russek *et al.*, 2000), $\gamma 2$ para ratón (Mu y Burt, 1999) y δ en rata y ratón (Motejlek *et al.*, 1994; Sommer *et al.*, 1990). La eliminación o mutación del segundo Inr causó un decremento significativo en la actividad del gen reportero luciferasa en células STC-1 y en explantes de retina de ratón (Figuras 18 y 23). En los promotores sin caja TATA, los elementos Inr regulan la fuerza del núcleo del promotor, determinan la posición del TSS y la interacción entre las proteínas de unión al Inr, así como los componentes de la maquinaria transcripcional basal reclutando a la RNA polimerasa II al complejo de inicio de la transcripción (Weis y Reinberg, 1992). De hecho, un elemento Inr que está presente en el núcleo del promotor de 0.270-kb del gen $\beta 1$ del receptor GABA_A en humano, media una regulación a la baja para la expresión de esta subunidad (Russek *et al.*, 2000).

Un punto importante es el hecho, que igual que otros genes que codifican para algunas subunidades del receptor GABA_A, las secuencias que codifican para las subunidades $\rho 1$ y $\rho 2$ se encuentran en tándem separadas por aproximadamente 40-kb (Greka *et al.*, 2000), sugiriendo que estos genes podrían compartir elementos que permiten su expresión en retina. Muchos genes de las subunidades del GABA_A-R están organizados en grupos de β - α - α - γ y β - α - γ en diferentes cromosomas (Wilke *et al.*, 1997). En humanos hay cuatro grupos de genes de las subunidades del receptor GABA_A: el grupo conformado por los genes $\beta 1$ - $\alpha 4$ - $\alpha 2$ - $\gamma 1$ ubicados en el cromosoma 4p14-q12 (Buckle *et al.*, 1989; Kirkness *et al.*, 1991; Wilcox *et al.*, 1992; McLean *et al.*, 1995; Russek, 1999), los genes $\beta 2$ - $\alpha 6$ - $\alpha 1$ - $\gamma 2$ en el cromosoma 5q31.2-q35 (Buckle *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1992; Wilcox *et al.*, 1992; Russek y Farb, 1994; Kostrzewa *et al.*, 1996; Russek, 1999), el grupo de genes $\beta 3$ -

$\alpha 5\text{-}\gamma 3$ localizados en el cromosoma 15q11-q13 (Wagstaff *et al.*, 1991a, b; Knoll *et al.*, 1993; Nakatsu *et al.*, 1993; Sinnott *et al.*, 1993; Greger *et al.*, 1995; Russek, 1999) y el grupo de genes que se ubica en el cromosoma Xq28 y que incluye a $\theta\text{-}\alpha 3\text{-}\varepsilon$ (Bell *et al.*, 1989; Levin *et al.*, 1996; Wilke *et al.*, 1997; Russek, 1999). La cercanía física de estos genes en el genoma sugiere que probablemente se lleva a cabo una regulación génica coordinada (Steiger y Russek, 2004).

Los genes que forman parte de familias génicas muy amplias se han originado a partir de eventos de duplicación génica (Lynch y Conery, 2000). Las secuencias codificantes de estos genes parálogos tienen la tendencia a estar muy conservados, así como sus intrones y promotores, además de que presentan funciones redundantes y esto se debe a que comparten algunos elementos *cis*-regulatorios. La transcripción de cada gen es regulada por FT y a nivel de promotores la función de estos se relaciona directamente con la posición relativa, la orientación y las secuencias nucleotídicas de los sitios de unión a FT en el promotor (Greer *et al.*, 2000). Aunque la organización de los sitios consenso puede estar conservada a lo largo de la evolución, los distintos “motifs” de ADN pueden actuar de manera independiente en respuesta a eventos transcripcionales señal-específicos y de esta forma proveer una regulación génica diferencial. Hasta la fecha se desconocen los sitios consenso para los FT dentro de los promotores de los genes que codifican para las distintas subunidades del receptor GABA_A , sin embargo, con predicciones *in silico* se han pronosticado algunos sitios consenso como PR (receptor de progesterona), ER (receptor de estrógenos), GR (receptor de glucocorticoides) y AR (receptor a andrógenos) (Steiger y Russek, 2004).

En años recientes, los ratones “knock out” han resultado ser una herramienta que ha generado información interesante acerca de la regulación de los genes GABA_A en cuanto a los requerimientos necesarios para la expresión de genes de los receptores GABA_A. Por ejemplo, en el ratón “knock out” para el gen $\alpha 6$ se observó que hay una baja en la expresión de las subunidades vecinas $\alpha 1$ y $\beta 2$ (Uusi-Oukari *et al.*, 2000); sin embargo, en la remoción de los genes $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 2$ y δ no hubo alteración en los niveles de transcripción de otros genes vecinos de la familia GABA_A (Gunther *et al.*, 1995; Homanics *et al.*, 1997; Fritschy *et al.*, 1998; Sur *et al.*, 2001; Tretter *et al.*, 2001), esto debido a la creciente evidencia que sugiere que la expresión regulada de genes depende más de la organización de los sitios de unión a FT dentro del promotor que a elementos *cis*-reguladores individuales (Lemon y Tjian, 2000).

La remoción y la generación de la mutante en el sitio de unión al factor de transcripción AP1 también causaron un decremento importante en la actividad del promotor GABA ρ 1. Los factores de transcripción AP1 son un grupo de proteínas que reconocen y se unen a sitios de ADN específicos en las regiones promotoras de los genes; sin embargo, muchos otros factores de transcripción reconocen el sitio de unión AP1. El factor de transcripción AP1 es un dímero y su complejidad comienza con el mismo factor de transcripción (Morgan y Curran, 1991). Está compuesto de muchas combinaciones diferentes de hetero y homodímeros y la composición determina cuáles genes regula. Sin embargo, hasta ahora se desconoce si algún miembro de la familia de los genes GABA_A interactúa con el factor de transcripción AP1 y si estas proteínas son importantes en la actividad transcripcional.

Algunos genes, como el del receptor metabotrópico de glutamato tipo 6 en ratón (mGluR6), la proteína de células de Purkinje (Pcp-2) y la proteína L7 de identificada inicialmente en

células de Purkinje (L7) son expresadas en las neuronas bipolares de la retina (Nawy y Jahr, 1990; Shiells y Falk, 1990; Nakajima *et al.*, 1993; Nomura *et al.*, 1994; Nordquist *et al.*, 1988; Oberdick *et al.*, 1988; Berrebi *et al.*, 1991), pero poco se sabe de los mecanismos transcripcionales que inducen o reprimen su expresión.

Ueda y colaboradores en 1997 determinaron el patrón de expresión temporal y espacial del mGluR6 usando un ratón transgénico, el cual expresa el gen reportero *lacZ* bajo la regulación de un fragmento de 9.5-kb ubicado en la región 5' flanqueante del gen mGluR6. Este fragmento de 9.5-kb del promotor del receptor mGluR6 induce la expresión regulada durante el desarrollo y de manera específica de célula en las neuronas bipolares de tipo ON. Un hecho interesante es que el gen reportero (β -gal) y el gen mGluR6 endógeno son expresados de manera coordinada durante el desarrollo con el patrón de diferenciación de las células bipolares, sugiriendo que este fragmento de ADN responde al programa genético de diferenciación de las neuronas bipolares de la retina (Ueda *et al.*, 1997). Hasta el momento, se desconoce una disección molecular detallada del promotor del mGluR6 y la identificación de posibles sitios de unión a factores de transcripción no ha sido reportada.

Pcp-2 también se expresa en las neuronas bipolares de retina y en las neuronas de Purkinje (Oberdick *et al.*, 1990). Un análisis de la secuencia de ADN ubicada río arriba del gen reveló la presencia de sitios de unión a factores de transcripción de tipo general como AP1, CRE y Oct. Cabe recalcar que un fragmento que incluye 0.4-kb río arriba y 0.3-kb río abajo del gen Pcp-2 activa la expresión de β -gal en un gran número de neuronas incluyendo las células de Purkinje y las neuronas bipolares. De manera opuesta, un fragmento de 3.1-kb adicional de las secuencias río arriba del gen Pcp-2 limitó la expresión de β -gal a las células de Purkinje, mientras que en las neuronas bipolares de retina no se activó la transcripción

del gen reportero. Estos resultados indican que el fragmento de 3.1-kb incluye elementos que reprimen la transcripción en neuronas bipolares, es decir, algunos componentes adicionales están relacionados con la regulación negativa del gen *Pcp-2* dentro de la retina (Vandaele *et al.*, 1991).

Para el estudio del patrón de expresión del gen *L7* se utilizó un ratón transgénico que dirige la expresión de β -gal. Este ratón incluye 4-kb río arriba del inicio del TSS y 2-kb río debajo de la señal de poliadenilación. Se lograron detectar altos niveles del gen reportero en la retina y en el cerebelo; sin embargo, las secuencias esenciales que dirigen la expresión en las neuronas bipolares no fueron exploradas en ese estudio (Oberdick *et al.*, 1990).

Cuando se electroporó la construcción que incluye el fragmento de 0.232-kb en cerebelos de ratón P6, no logramos detectar niveles significativos de GFP después de 8 días *in vitro* (Figura 26). Es posible que otras secuencias regulatorias sean requeridas para la expresión del receptor GABA ρ 1 en neuronas y en glía del cerebelo, en donde esta subunidad se ha logrado detectar mediante técnicas como qRT-PCR, inmunofluorescencias y registros electrofisiológicos (Harvey *et al.*, 2006, Mejía *et al.*, 2008, Reyes-Haro *et al.*, 2013).

Se destaca que las inmunofluorescencias de nuestros resultados mostraron que el fragmento de 0.232-kb es capaz de activar la transcripción de GFP en la glía de Müller en retinas de ratón P0 electroporadas *in vitro*. Algunos datos de nuestro laboratorio, tales como hibridaciones *in situ* e inmunocitoquímicas, sugieren que tanto el ARNm y la subunidad GABA ρ 1 se encuentran presentes en la glía de Müller de la retina de ratón respectivamente (comunicación personal González-González, 2011); sin embargo, otras pruebas como un doble inmunomarcaje son necesarios para confirmar estos datos.

Trabajos previos han reportado la presencia de los receptores GABA_A en la glía de Bergmann y en otras células gliales del SN (Verkhatsky y Butt, 2008). Mediante registros electrofisiológicos e inmunocitoquímicas se conocen las propiedades y localización de los receptores GABA_A en las células gliales de la retina (Clark y Mobbs, 1992; Malchow *et al.*, 1989), cerebelo (Müller *et al.*, 1994), astrocitos de la zona subventricular del cuarto ventrículo y en células gliales ependimales (Martínez-Delgado *et al.*, 2011; Reyes-Haro *et al.*, 2013), cuerpo calloso (Berger *et al.*, 1992) e hipocampo (Steinhäuser *et al.*, 1994).

Más estudios son necesarios para esclarecer y determinar puntos importantes como la expresión y localización de los receptores GABA_ρ en el SN y fuera de este, ya que su amplia distribución sugiere que participa en más funciones de las que se han planteado hasta el momento (Martínez-Delgado *et al.*, 2010). Por ejemplo, se sugiere que los receptores GABA_ρ participan en procesos de memoria (Gamel-Didelon *et al.*, 2003), así como en el control del movimiento al expresarse en diferentes regiones tales como las motoneuronas de la médula espinal, las células de Purkinje de la corteza cerebelar, bulbo, puente y núcleo caudado (Rozzo *et al.*, 2002; López-Chávez *et al.*, 2005), además de su expresión en la amígdala y su posible relación con la ansiedad (Cunha *et al.*, 2010).

También en algunas patologías se han relacionado a los receptores GABA_A, incluyendo a los receptores GABA_ρ, por ejemplo en el alcoholismo, en el cual se reduce la recaptura del ion cloruro mediada por los receptores GABA_A (Morrow *et al.*, 1990; Sanna *et al.*, 1993; Devaud *et al.*, 1996). Hay algunos estudios que han demostrado una baja en la función de los receptores GABA_A y esta va acompañada de alteraciones significativas en la expresión génica de sus subunidades (Grobin *et al.*, 2000). En ratas alcohol-dependientes, se observó un decremento en los niveles de expresión del gen $\alpha 1$ y un incremento de $\alpha 4$ a niveles

corticales (Mhatre y Ticku, 1992; Mhatre *et al.*, 1993; Devaud *et al.*, 1995, 1997). La administración crónica de etanol reduce los niveles de expresión de los ARNm de los genes $\alpha 2$ y $\alpha 5$ (Mhatre y Ticku, 1992; Mhatre *et al.*, 1993). En contraste, los niveles de expresión a nivel de ARNm y proteína de los genes $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\gamma 1$ se incrementaron (Mhatre y Ticku, 1994; Devaud *et al.*, 1995, 1997). En el caso de las subunidades GABA ρ , se relaciona con un polimorfismo de un solo nucleótido en la secuencia que codifica para el receptor GABA $\rho 2$ (Xuei *et al.*, 2009).

En epilepsia se han documentado alteraciones en la unión del GABA al receptor (Lloyd *et al.*, 1986), una reducción en la modulación por benzodiazepinas en neuronas del hipocampo (Shumate *et al.*, 1998; Brooks-Kayal *et al.*, 1999), así como cambios en la expresión de las subunidades del receptor GABA $_A$ en pacientes con esclerosis hipocampal (Loup *et al.*, 2000). En gliomas, astrocitomas y tumores oligodendrogiales se han observado alteraciones en los niveles de expresión y distribución celular de las subunidades GABA ρ , de manera particular la subunidad GABA $\rho 2$ (Smits *et al.*, 2012).

Conclusiones

Se lograron confirmar el TSS y el UTR 5' del gen GABA ρ 1. La actividad transcripcional del promotor GABA ρ 1 va en aumento conforme se acorta su longitud, mostrando los valores más altos el fragmento de 0.232-kb en líneas celulares transfectadas y en retinas electroporadas *in vitro*; sin embargo, con el fragmento de 0.131-kb la actividad transcripcional decrece de manera significativa en la línea celular STC-1 y en la retina, sugiriendo así que la región de 0.232-kb corresponde al mínimo promotor del gen GABA ρ 1 en ambos modelos.

El elemento Inr y el sitio AP1 son importantes para la activación de la transcripción en las células STC-1 transfectadas y en explantes de retina. El fragmento de 0.232-kb activa la transcripción de manera específica en las neuronas bipolares de la capa nuclear interna.

Bibliografía

1. Adamian L., Gussin H. A., Tseng Y. Y., Muni N. J., Feng F., Qian H., Pepperberg D. R. y Liang J. (2009) Structural model of $\rho 1$ GABA_C receptor based on evolutionary analysis: Testing of predicted protein-protein interactions involved in receptor assembly and function. *Protein Sci.* **18(11)**, 2371-2383.
2. Akbarian S., Huntsman M. M., Kim J. J., Tafazzoli A., Potkin S. G., Bunney Jr. W. E. y Jones E. G. (1995) GABA_A receptor subunit gene expression in human prefrontal cortex: comparison of schizophrenics and controls. *Cereb. Cortex.* **5**, 550-560.
3. Backus K. H., Arigoni M., Drescher U., Scheurer L., Malherbe P., Mohler H. y Benson J. A. (1993) Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor deduced from mutation-induced rectification. *Neuro-Report.* **5**, 285-288.
4. Bahn S., Jones A. y Wisden W. (1997) Directing gene expression to cerebellar granule cells using γ -aminobutyric acid type A receptor $\alpha 6$ subunit transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9417-9421.
5. Bailey M. E., Albrecht B. E., Johnson K. J. y Darlison M. G. (1999) Genetic linkage and radiation hybrid mapping of the three human GABA_C receptor rho subunit genes: GABRR1, GABRR2 and GABRR3. *Biochem. Biophys. Acta.* **1447(2-3)**, 307-312.
6. Bateson A. N., Ultsch A. y Darlison M. G. (1995) Isolation and sequence analysis of the chicken GABA_A receptor $\alpha 1$ -subunit gene promoter. *Gene.* **153(2)**, 243-7.
7. Bell M. V., Bloomfield J., McKinley M., Patterson M. N., Darlison M. G., Barnard E. A. y Davies K. E. (1989) Physical linkage of a GABA_A receptor subunit gene to the DXS374 locus in human Xq28. *Am. J. Hum. Genet.* **45**, 883-888.
8. Berger T., Waltz W., Schnitzer J., Kettenmann H. (1992) GABA and glutamate active currents in glial cell of corpus callosum slice. *J. Neurosci. Res.* **31**, 21-27.
9. Berrebi A. S., Oberdick J., Sangameswaran L., Christakos S., Morgan J. I. y Mugnaini E. (1991) Cerebellar Purkinje cell markers are expressed in retinal bipolar cells. *J. Comp. Neurol.* **308**, 630-649.
10. Boller M. y Schmidt M. (2001) Postnatal maturation of GABA_A and GABA_C receptor function in the mammalian superior colliculus. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 1185-1193.

11. Bormann J. (2000) The ABC of GABA receptors. *TiPS*. **21**, 16-19.
12. Boue-Grabot E., Roudbaraki M., Bascles L., Tramu G., Bloch B. y Garret M. (1998) Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J. Neurochem.* **70**, 899-907.
13. Breathnach R. y Chambon P. (1981) Organization y expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 349-383.
14. Brooks-Kayal A. R., Shumate M. D., Jin H., Lin D. D., Rikhter T. Y., Holloway K. L. y Coulter, D. A. (1999) Human neuronal γ -aminobutyric acid_A receptors: coordinated subunit mRNA expression and functional correlates in individual dentate granule cells. *J. Neurosci.* **19**, 8312-8318.
15. Buckle V. J., Fujita N., Ryder-Cook A. S., Derry J. M., Barnard P. J., Lebo R. V., Schofield P. R., Seeburg P. H., Bateson A. N., Darlison M. G. y Barnard E. A. (1989) Chromosomal localization of GABA_A receptor subunit genes: relationship to human genetic disease. *Neuron*. **3**, 647-654.
16. Carninci P., Sandelin A., Lenhard B., Katayama S., Shimokawa K., Ponjavic J., Semple C. A., Taylor M. S., Engström P. G., Frith M. C., Forrest A. R. Alkema W. B., Tan S. L., Plessy C., Kodzius R., Ravasi T., Kasukawa T., Fukuda S., Kanamori-Katayama M., Kitazume Y., Kawaji H., Kai C., Nakamura M., Konno H., Nakano K., Mottagui-Tabar S., Arner P., Chesi A., Gustincich S., Persichetti F., Suzuki H., Grimmond S. M., Wells C. A., Orlando V., Wahlestedt C., Liu E. T., Harbers M., Kawai, J., Bajic V. B., Hume D.A. y Hayashizaki Y. (2006) Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat. Genet.* **38**, 626-635.
17. Chang Y., Wang R., Barot S. y Weiss D. S. (1996) Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor. *J. Neurosci.* **16**, 5415-5424.
18. Chang Y. y Weiss D. S. (1997) Substitutions of the highly conserved M2 leucine create spontaneously opening $\rho 1$ γ -aminobutyric acid receptors. *Mol. Pharm.* **53**, 511-523.
19. Chebib M. (2004) GABA_C receptor ion channel. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31**, 800-804.
20. Clark B. y Mobbs P. (1992) Transmitter-operated channels in rabbit retinals astrocytes studied in situ by whole cell-patch clamping. *J. Neurosci.* **12**, 664-673.

21. Cunha C., Monfils M. H. y Ledoux J. E. (2010) GABA(C) receptors in the lateral amygdala: a possible novel target for the treatment of fear and anxiety disorders?. *Front. Behav. Neurosci.* **12**, 4-6.
22. Cutting G. R., Curristin S., Zoghbi H., O'Hara B., Seldin M. F. y Uhl G. R. (1992) Identification of a putative γ -aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho2 cDNA and colocalization of the genes encoding rho2 (GABRR2) and rho1 (GABRR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4. *Genomics.* **12**, 801-806.
23. Davies P. A., McCartney M. R., Wang W., Hales T. G. y Kirkness E. F. (2002) Alternative transcripts of the GABA_A receptor ϵ subunit in human and rat. *Neuropharmacology.* **43(4)**, 467-75.
24. Denter D. G., Heck N., Riedemann T., White R., Kilb W. y Luhmann H. J. (2010) GABA_C receptors are functionally expressed in the intermediate zone and regulate radial migration in the embryonic mouse neocortex. *Neuroscience.* **167**, 124-134.
25. Devaud L. L., Smith F. D., Grayson D. R. y Morrow A. L. (1995) Chronic ethanol consumption differentially alters the expression of γ -aminobutyric acid_A receptor subunit mRNAs in rat cerebral cortex: competitive, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Mol. Pharmacol.* **48**, 861-868.
26. Devaud L. L., Purdy R. H., Finn D. A. y Morrow A. L. (1996) Sensitization of γ -aminobutyric acid_A receptors to neuroactive steroids in rats during ethanol withdrawal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 510-517.
27. Devaud L. L., Fritschy J. M., Sieghart W. y Morrow A. L. (1997) Bidirectional alterations of GABA_A receptor subunit peptide levels in rat cortex during chronic ethanol consumption and withdrawal. *J. Neurochem.* **69**, 126-130.
28. Didelon F., Sciancalepore M., Savic' N., Mladinic' M., Bradbury A. y Cherubini E. (2002) γ -Aminobutyric acid_A ρ receptor subunits in the developing rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* **67**, 739-744.
29. Eng L. F. y Lee Y. L. (1995) Intermediate filaments in astrocytes. In: Kettenmann H., Ransom B. R., eds. *Neuroglia*. New York: Oxford University Press. 650-667.
30. Enz R., Brandstätter J., Wässle H. y Bormann J. (1996) Immunocytochemical localization of the GABA_C receptor rho subunits in the mammalian retina. *J. Neurosci.* **16**, 4479-4490.

31. Enz R. y Cutting G. R. (1999) GABA_C receptor rho subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo and heterooligomers with distant physical properties. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 41-50.
32. Estrada-Mondragón A., Reyes-Ruiz J. M., Martínez-Torres A. y Miledi R. (2010) Structure-function study of the fourth transmembrane segment of the GABA_A1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107(41)**, 17780-17784.
33. Feigenspan A. y Bormann J. (1998) GABA-gated Cl⁻ channels in the rat retina. *Prog. Ret. Eye. Res.* **17**, 99-126.
34. Fletcher E. L., Koulen P. y Wässle H. (1998) GABA_A y GABA_C receptors on mammalian rod bipolar cells. *J. Comp. Neurol.* **396(3)**, 351-365.
35. Fletcher E. L., Clark M. J., Senior P. y Furness J. B. (2001) Gene expression and localization of GABA_C receptors in neurons of the rat gastrointestinal tract. *Neuroscience.* **107**, 181-189.
36. Fritschy J. M., Johnson D. K., Mohler H. y Rudolph U. (1998) Independent assembly and subcellular targeting of GABA_A receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons *in vivo*. *Neurosci. Lett.* **249**, 99-102.
37. Fuchs K. y Celepirovic N. (2002) The 5'-flanking region of the rat GABA_A receptor α 2-subunit gene (GABRA2). *J. Neurochem.* **82**, 1512-1523.
38. Fujii E. y Mellon S. H. (2001) Regulation of uterine gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunit expression throughout pregnancy. *Endocrinology.* **142(5)**, 1770-1777.
39. Gamel-Didelon K., Kunz L., Fohr K. J., Gratzl M. y Mayerhofer A. (2003) Molecular and physiological evidence for functional gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptors in growth hormone-secreting cells. *J. Biol. Chem.* **278(22)**, 20193-20195.
40. González-González M. A. (2011) Análisis de la distribución del receptor GABA_A en la zona periventricular del cerebelo. Tesis de maestría. INB. UNAM.
41. Greer J. M., Puetz J., Thomas K. R. y Capecchi M. R. (2000) Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature.* **403**, 661-665.
42. Greger V., Knoll J. H., Woolf E., Glatt K., Tyndale R. F., DeLorey T. M., Olsen R. W., Tobin A. J., Sikela J. M., Nakatsu Y., Brilliant M. H., Whiting P. J. y Lalande M. (1995) The γ -aminobutyric acid receptor γ 3 subunit gene

- (GABRG3) is tightly linked to the $\alpha 5$ subunit gene (GABRA5) on human chromosome 15q11-q13 and is transcribed in the same orientation. *Genomics*. **26**, 258-264.
43. Greka A., Koolen J. A., Lipton S. A. y Zhang D. (1998) Cloning and characterization of mouse GABA_C receptor subunits. *Neuroreport*. **9(2)**, 229-232.
 44. Greka A., Lipton S. A. y Zhang D. (2000) Expression of GABA_C receptor rho1 and rho2 subunits during development of the mouse retina. *Eur. J. Neurosci*. **12(10)**, 3575-3582.
 45. Grobin A. C., Papadeas S. T. y Morrow A. L. (2000) Regional variations in the effects of chronic ethanol administration on GABA_A receptor expression: potential mechanisms. *Neurochem. Int.* **37**, 453-461.
 46. Gunther U., Benson J., Benke D., Fritschy J. M., Reyes G., Knoflach F., Crestani F., Aguzzi A., Arigoni M., Lang Y., Bluethmann H., Mohler H. y Luscher B. (1995) Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the $\gamma 2$ subunit gene of γ -aminobutyric acid type A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7749-7753.
 47. Harvey V. L., Duguid I. C., Krasel C. y Stephens G. J. (2006) Evidence that GABA ρ subunits contribute to functional ionotropic GABA receptors in mouse cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* **577**, 127-139.
 48. Haverkamp S., Ghosh K. K., Hirano A. A. y Wässle H. (2003) Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *The Journal of comparative neurology*. **455(4)**, 463-476.
 49. Hebert S. C. (1998) General principles of the structure of ion channels. *Am. J. Med.* **104**, 87-98.
 50. Hedblom E. y Kirkness E. F. (1997) A novel class of GABA_A receptor subunit in tissues of the reproductive system. *J. Biol. Chem.* **272**, 15346-15350.
 51. Herb A., Wisden W., Luddens H., Puia G., Vicini S. y Seeburg P. H. (1992) The third gamma subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**.
 52. Homanics G. E., DeLorey T. M., Firestone L. L., Quinlan J. J., Handforth A., Harrison N. L., Krasowski M. D., Rick C. E., Korpi E. R., Makela R., Brilliant M. H., Hagiwara N., Ferguson C., Snyder K. y Olsen R. W. (1997) Mice devoid of γ -aminobutyrate type A receptor $\beta 3$ subunit have epilepsy, cleft palate, and hypersensitive behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4143-4148.

53. Huntsman M. M., Tran B. V., Potkin S. G., Bunney Jr. W. E. y Jones E. G. (1998) Altered ratios of alternatively spliced long and short $\gamma 2$ subunit mRNAs of the γ -aminobutyrate type A receptor in prefrontal cortex of schizophrenics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15066-15071.
54. Jansen A., Hoepfner M., Herzig K. H., Riecken E. O. y Sherübl H. (2000) GABA_C receptors in neuroendocrine gut cells: a new GABA-binding site in the gut. *Pflügers Arch.* **441**, 294-300.
55. Jechlinger M., Pelz R., Tretter V., Klausberger T. y Sieghart, W. (1998) Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABA_A receptors containing $\alpha 6$ subunits. *J. Neurosci.* **18**, 2449-2457.
56. Johnson K. J., Sander T., Hicks A. A., van Marle A., Janz D., Mullan M. J., Riley B. P. y Darlison M. G. (1992) Confirmation of the localization of the human GABA_A receptor $\alpha 1$ -subunit gene (GABRA1) to distal 5q by linkage analysis. *Genomics.* **14**, 745-748.
57. Jones A., Bahn S., Grant A. L., Kohler M. y Wisden W. (1996) Characterization of a cerebellar granule cell-specific gene encoding the γ -aminobutyric acid type A receptor $\alpha 6$ subunit. *J. Neurochem.* **67**, 907-916.
58. Joyce J. C. (2007) *In silico* comparative genomic analysis of GABA_A receptor transcriptional regulation. *Genomics.* **8**, 203.
59. Kang I., Lindquist D., Kinane T., Ercolani L., Pritchard G. y Miller L. (1994) Isolation and Characterization of the Promoter of the Human GABA_A Receptor $\alpha 1$ Subunit Gene. *J. Neurochemistry.* **62(4)**, 1643-1646.
60. Kim Y., Glatt H., Xie W., Sinnott D. y Lalande M. (1997) Human γ -aminobutyric acid type A receptor $\alpha 5$ subunit gene (GABRA5): characterization and structural organization of the 5'-flanking region. *Genomics.* **42**, 378-387.
61. Kim D. S., Ross S. E., Trimarchi J. M., Aach J., Greenberg M. E. y Cepko C. L. (2008) Identification of molecular markers of bipolar cells in the murine rat. *The Journal of comparative neurology.* **507**, 1795-1810.
62. Kirkness E. F., Kusiak J. W., Fleming J. T., Menninger J., Gocayne J. D., Ward D. C. y Venter J. C. (1991) Isolation, characterization, and localization of human genomic DNA encoding the $\beta 1$ subunit of the GABA_A receptor (GABRB1). *Genomics.* **10**, 985-995.
63. Kirkness E. F. y Fraser C. M. (1993) A strong promoter element is located between alternative exons of a gene encoding the human γ -aminobutyric acid-type A receptor $\beta 3$ subunit (GABR3). *J. Biol. Chem.* **268**, 4420-4428.

64. Knoll J. H., Sinnott D., Wagstaff J., Glatt K., Wilcox A. S., Whiting P. M., Wingrove P., Sikela J. M. y Lalonde M. (1993) FISH ordering of reference markers and of the gene for the $\alpha 5$ subunit of the γ -aminobutyric acid receptor (GABRA5) within the Angelman and Prader-Willi syndrome chromosomal regions. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 183-189.
65. Korpi E. R. y Sinkkonen S.T. (2006) GABA(A) receptor subtypes as targets for neuropsychiatric drug development. *Pharmacol. Ther.* **109(1-2)**, 12-32.
66. Kostrzewa M., Kohler A., Eppelt K., Hellam L., Fairweather N. D., Levy E. R., Monaco A. P. y Muller U. (1996) Assignment of genes encoding GABA_A receptor subunits $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 2$, and $\gamma 2$ to a YAC contig of 5q33. *Eur. J. Hum. Genet.* **4**, 199-204.
67. Koulen P., Brandstätter J. H., Kröger S., Enz R, Bormann J. y Wässle H. (1997) Immunocytochemical localization of the GABA_C receptor ρ subunits in the cat, goldfish, and chicken retina. *The Journal of comparative neurology.* **380**, 520-532.
68. Kuzmanovic M., Dudley V. J. y Sarthy V. P. (2003) GFAP promoter drives Müller cell-specific expression in transgenic mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44(8)**, 3606-3613.
69. Laurie D. J., Wisden W. y Seeburg P. H. (1992) The distribution of thirteen GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.* **12**, 4151-4172.
70. Lemon B. y Tjian R. (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* **14**, 2551-2569.
71. Levin M. L., Chatterjee A., Pragliola A., Worley K. C., Wehnert M., Zhuchenko O., Smith R. F., Lee C. C. y Herman, G. E. (1996) A comparative transcription map of the murine bare patches (Bpa) and striated (Str) critical regions and human Xq28. *Genome Res.* **6**, 465-477.
72. Li M. y De Blas A. L (1997) Coexistence of two beta subunit isoforms in the same gamma-aminobutyric acid type A receptor. *J. Biol. Chem.* **272(26)**, 16564-16569.
73. Li S., Zhang Y., Liu H., Yan Y. y Li Y. (2008) Identification and expression of GABA_C receptor in rat testis and spermatozoa. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* **40**, 761-767.
74. Loup F., Wieser H. G., Yonekawa Y., Aguzzi A. y Fritschy J. M. (2000) Selective alterations in GABA_A receptor subtypes in human temporal lobes epilepsy. *J. Neurosci.* **20**, 5401-5419.

75. Lloyd K. G., Bossi L., Morselli P. L., Munari C., Rougier M. y Loiseau H. (1986) Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy. *Adv. Neurol.* **44**, 1033-1044.
76. Lukasiewicz P. D. (1996) GABA_C receptors in the vertebrate retina. *Mol. Neurobiol.* **12**(3), 181-194.
77. Lynch M. y Conery J. S. (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science.* **290**, 1151-1155.
78. Ma L., Song L., Radoi G. E. y Harrison N. L. (2004) Transcriptional regulation of the mouse gene encoding the α -4 subunit of the GABA_A receptor. *J. Biol. Chem.* **279**(39), 40451-40461.
79. Macdonald R. L. y Olsen R. W. (1994) GABA_A receptor channels. *Annual review of Neuroscience.* **17**, 569-602.
80. Malchow R. P., Qian H. H. y Ripps H. (1989) Gamma aminobutyric acid (GABA), Induced currents of skate Müller (glia) cells are mediated by neuronal like GABA_A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 4220-4230.
81. Martin D. L. y Olsen R. W. (2000) GABA in the Nervous System: The View at Fifty Years. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
82. Martínez-Delgado G., Estrada-Mondragón, A. R., Miledi R. y Martínez-Torres A. (2010) An update on GABA ρ receptors. *Current Neuropharmacology.* **8**, 422-433.
83. Martínez-Delgado G., Reyes-Haro D., Espino-Saldaña A. E., Rosas-Arellano A., Pétriz A., Juárez-Mercado P., Miledi R. y Martínez-Torres A. (2011) Dynamic targeting of GABA ρ 2 receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes in culture. *Neuroreport.* **22**, 4-9.
84. Martínez-Torres A., Vázquez A. E., Panicker M. M. y Miledi R. (1998) Cloning and functional expression of alternative splice variants of the rho1 gamma-aminobutyric receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**(7), 4019-4022.
85. Martínez-Torres A. y Miledi R. (1999) Expression of gamma-aminobutyric acid rho1 and rho1delta450 as gene fusions with the green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1947-1951.
86. Mhatre M. C. y Ticku M. K. (1992) Chronic ethanol administration alters γ -aminobutyric acid_A receptor gene expression. *Mol. Pharmacol.* **42**, 415-422.
87. Mhatre M. C., Pena G., Sieghart W. y Ticku M. K. (1993) Antibodies specific for GABA_A receptor α subunits reveal that chronic alcohol treatment down-

- regulates α -subunit expression in rat brain regions. *J. Neurochem.* **61**, 1620-1625.
88. Mhatre M. y Ticku M. K. (1994) Chronic ethanol treatment upregulates the GABA receptor β subunit expression. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **23**, 246-252.
 89. McCall M. A., Lukasiewicz P. D., Gregg R. G. y Peachey N. S. (2002) Elimination of the $\rho 1$ subunit abolishes GABA_C receptor expression and alters visual processing in the mouse retina. *The Journal of Neuroscience.* **22(10)**, 4163-4174.
 90. McGillem G. S., Rotolo T. C. y Dacheux R. F. (2000) GABA responses of rod bipolar cells in rabbit retinal slices. *Vis. Neurosci.* **17**, 381-389.
 91. McKinley D. D., Lennon D. J. y Carter D. B. (1995) Cloning, sequence analysis and expression of two forms of mRNA coding for the human $\beta 2$ subunit of the GABA_A receptor. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **28(1)**, 175-9.
 92. McLean P. J., Farb D. H. y Russek S. J. (1995) Mapping of the $\alpha 4$ subunit gene (GABRA4) to human chromosome 4 defines an $\alpha 2$ - $\alpha 4$ - $\beta 1$ - $\gamma 1$ gene cluster: further evidence that modern GABA_A receptor gene clusters are derived from an ancestral cluster. *Genomics.* **26**, 580-586.
 93. McLean P. J., Shpektor D., Bandyopadhyay S., Russek S. J. y Farb D. H. (2000) A minimal promoter for the GABA_A receptor $\alpha 6$ -subunit gene controls tissue-specificity. *J. Neurochem.* **74(5)**, 1858-1869.
 94. Mejía C., García-Alcocer G., Berumen L. C., Rosas-Arellano A., Miledi R. y Martínez-Torres A. (2008) Expression of GABA ρ subunits during rat cerebellum development. *Neurosci. Lett.* **432**, 1-6.
 95. Mizukami K., Ikonovic M. D., Grayson D. R., Rubin R. T., Warde D., Sheffield R., Hamilton R. L., Davies, P. y Armstrong D. M. (1997) Immunohistochemical study of GABA_A receptor $\beta 2/3$ subunits in the hippocampal formation of aged brains with Alzheimer-related neuropathologic changes. *Exp. Neurol.* **147**, 333-345.
 96. Mizukami K., Grayson D. R., Ikonovic M. D., Sheffield R. y Armstrong D. M. (1998) GABA_A receptor $\beta 2$ and $\beta 3$ subunits mRNA in the hippocampal formation of aged human brain with Alzheimer-related neuropathology. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **56**, 268-272.
 97. Mizukami K., Ikonovic M. D., Grayson D. R., Sheffield R. y Armstrong D. M. (1998) Immunohistochemical study of GABA_A receptor $\alpha 1$ subunit in the hippocampal formation of aged brains with Alzheimer-related neuropathologic changes. *Brain Res.* **799**, 148-155.

98. Morgan J. I. y Curran T. (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**, 431-451.
99. Morrow A. L., Montpied P., Lingford-Hughes A. y Paul S. M. (1990) Chronic ethanol and pentobarbital administration in the rat: effects on GABA_A receptor function and expression in brain. *Alcohol.* **7**, 237-244.
100. Motejlek K., Hauselmann R., Leitgeb S. y Luscher B. (1994) BSF1, a novel brain-specific DNA-binding protein recognizing a tandemly repeated purine DNA element in the GABA_A receptor δ subunit gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 15265-15273.
101. Mu W. y Burt D. R. (1999) The mouse GABA_A receptor $\alpha 3$ subunit gene and promoter. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **73(1-2)**, 172-180.
102. Mu W. y Burt D. R. (1999) Transcriptional regulation of GABA_A receptor $\gamma 2$ subunit gene. *Brain. Res. Mol. Brain Res.* **67**, 137-147.
103. Müller T., Fritschy J. M., Grosche J., Möhler H., Kettenmann H. (1994) Developmental regulation of voltage-gate K⁺ channel and GABA receptor expression in Bergmann glial cells. *J. Neurosci.* **14**, 2503-2514.
104. Nakajima Y., Iwakabe H., Akazawa C., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S. (1993) Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.* **268**, 11868-11873.
105. Nakatsu Y., Tyndale R. F., DeLorey T. M., Durham-Pierre D., Gardner J. M., McDanel H. J., Nguyen Q., Wagstaff J., Lalande M., Sikela J. M., Olsen R. W., Tobin A. J. y Brilliant M. (1993) A cluster of three GABA_A receptor subunit genes is deleted in a neurological mutant of the mouse p locus. *Nature.* **364**, 448-450.
106. Nawy S. y Jahr C. E. (1990) Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature.* **346**, 269-271.
107. Nayeem N., Green T. P., Martin L. I. y Barnard E. A. (1994) Quaternary structure of the native GABA_A receptor determined by Electron Microscopic Image Analysis. *J. Neurochem.* **62**, 815-818.
108. Nomura A., Shigemoto R., Nakamura Y., Okamoto N., Mizuno N. y Nakanishi S. (1994) Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell.* **77**, 361-369.

109. Nordquist D. T., Kozak C. A. y Orr H. T. (1988) cDNA cloning and characterization of three genes uniquely expressed in cerebellum by Purkinje cells. *J. Neurosci.* **8**, 4780-4789.
110. Oberdick J., Levinthal F. y Levinthal C. (1988) A Purkinje cell differentiation marker shows a partial DNA sequence homology to the cellular sis/PDGF2 gene. *Neuron.* **1**, 367-376. (Erratum. **3**, 385).
111. Oberdick J., Smeyne R. J., Mann J. R., Zackson S. y Morgan J. I. (1990) A promoter that drives transgene expression in cerebellar Purkinje and retinal bipolar cells. *Science.* **248**, 223-226.
112. Ogurusu T., Yanagi K., Watanabe M., Fukaya M. y Shingai R. (1999) Localization of GABA receptors rho2 and rho3 subunits in rat brain and functional expression of homooligomeric rho3 receptors and heterooligomeric rho2 and rho3 receptors. *Receptors channels.* **6(6)**, 463-475.
113. Ohnuma T., Augood S. J., Arai H., McKenna P. J. y Emson P. C. (1999) Measurement of GABAergic parameters in the prefrontal cortex in schizophrenia: focus on GABA content, GABA_A receptor α -1 subunit messenger RNA and human GABA transporter-1 (HGAT-1) messenger RNA expression. *Neuroscience.* **93**, 441-448.
114. Olsen R. W. y Sieghart W. (2008) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol. Rev.* **60**, 243-260.
115. Pan Z. H. y Lipton S. A. (1995) Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals. *The Journal of Neuroscience.* **15(4)**, 2668-2679.
116. Polenzani L., Woodward R. M. y Miledi R. (1991) Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4318-4332.
117. Qian H. y Dowling J. E. (1993) Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature.* **361**, 162-164.
118. Ragozzino D., Woodward R. M., Murata Y., Eusebi F., Overman L. E. y Miledi R. (1996) Design and *in vitro* pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acid receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1024-1030.
119. Reyes-Haro D., González-González M. A., Pétriz A., Rosas-Arellano A., Kettenmann H., Miledi R. y Martínez-Torres A. (2013) γ -aminobutyric acid-

- ρ expression in ependymal glial cells of the mouse cerebellum. *J. Neurosci. Res.* **91**, 527-534.
120. Rosas-Arellano A., Parodi J., Machuca-Parra A. I., Sánchez-Gutiérrez A., Inestrosa N. C., Miledi R. y Martínez-Torres A. (2011) The GABA(A) ρ receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amygdala and visual cortex. *Neurosci. Lett.* **500**, 20-25.
 121. Rosas-Arellano A., Machuca-Parra A. I., Reyes-Haro D., Miledi R. y Martínez-Torres A. (2012) Expression of GABA ρ receptors in the neostriatum: localization in aspiny, medium spiny neurons and GFAP-positive cells. *J. Neurochem.* **122(5)**, 900-910.
 122. Rozzo A., Armellin M., Franzot J., Chiaruttini C., Nistri A. y Tongiorgi E. (2002) Expression and dendritic mRNA localization of GABA_C receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 1747-1758.
 123. Russek S. J. y Farb D. H. (1994) Mapping of the β 2 subunit gene (GABRB2) to microdissected human chromosome 5q34-q35 defines a gene cluster for the most abundant GABA_A receptor isoform. *Genomics.* **23**, 528-533.
 124. Russek S. J. (1999) Evolution of GABA_A receptor diversity in the human genome. *Gene.* **227**, 213-222.
 125. Russek S. J., Bandyopadhyay S. y Farb D. H. (2000) An initiator element mediates autologous downregulation of the human type A γ -aminobutyric acid receptor β 1 subunit gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8600-8605.
 126. Sagdullaev B. T., McCall M. A. y Lukasiewicz P. D. (2006) Presynaptic inhibition modulates spillover, creating distinct dynamic response ranges of sensory output. *Neuron.* **50(6)**, 923-935.
 127. Sanna E., Serra M., Cossu A., Colombo G., Follesa P., Cuccheddu T., Concas A. y Biggio G. (1993) Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABA_A and NMDA receptor function in the rat brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **17**, 115-123.
 128. Sarthy V. y Ripps H. (2001) The retinal Müller cell: Structure and Function. New York: Kluwer Academic/Plenum Press.
 129. Shiells R. A. y Falk G. (1990) Glutamate receptor of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol].* **242**, 91-94.

130. Shumate M. D., Lin D. D., Gibbs III J. W., Holloway K. L. y Coulter D. A. (1998) GABA_A receptor function in epileptic human dentate granule cells: comparison to epileptic and control rat. *Epilepsy. Res.* **32**, 114-128.
131. Sieghart W., Fuchs K., Tretter V., Ebert V., Jechlinger M., Hoyer H. y Adamiker D. (1999) Structure and subunit composition of GABA_A receptors. *Neurochem. Int.* **34**, 379-385.
132. Simon J., Wakimoto H., Fujita N., Lalande M. y Barnard E. A. (2004) Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *The Journal of Biological Chemistry.* **279(40)**, 41422-41435.
133. Sinnott D., Wagstaff J., Glatt K., Woolf E., Kirkness E. J. y Lalande M. (1993) High-resolution mapping of the γ -aminobutyric acid receptor subunit $\beta 3$ and $\alpha 5$ gene cluster on chromosome 15q11-q13, and localization of breakpoints in two Angelman syndrome patients. *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 1216-1229.
134. Sinkkonen S. T., Hanna M. C., Kirkness E. F., Korpi E. R. (2000) GABA_A receptor ϵ and θ subunits display unusual structural variation between species and are enriched in the rat locus ceruleus. *J. Neurosci.* **20(10)**, 3588-95.
135. Smits A., Jin Z., Elsir T., Pedder H., Nistér M., Alafuzoff I., Dimberg A., Edqvist P., Pontén F., Aronica E. y Birnir B. (2012) GABA-A channel subunit expression in human glioma correlates with tumor histology and clinical outcome. *PLoS ONE.* **7(5)**.
136. Soghomonian J. y Martin D. (1998) Two isoforms of glutamate decarboxylase: why?. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**, 500-505.
137. Sommer B., Poustka A., Spurr N. K. y Seeburg P. H. (1990) The murine GABA_A receptor δ -subunit gene: structure and assignment to human chromosome 1. *DNA. Cell. Biol.* **9**, 561-568.
138. Steiger J. L. y Russek S. J. (2004) GABA_A receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters and cognate transcription factors. *Pharmacology & Therapeutics.* **101**, 259-281.
139. Steinhäuser C., Jabs R. y Kettenmann H. (1994) Glutamate activates a cationic conductance and blocks a potassium currents in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus.* **4**, 19-36
140. Sur C., Wafford K. A., Reynolds D. S., Hadingham K. L., Bromidge F., Macaulay A., Collinson N., O'Meara G., Howell O., Newman R., Myers J., Atack J. R., Dawson G. R., McKernan R. M., Whiting P. J. y Rosahl T. W. (2001) Loss of the major GABA_A receptor subtype in the brain is not lethal in mice. *J. Neurosci.* **21**, 3409-3418.

141. Tsang S. Y., Ng S. K., Xu Z. y Xue H. (2007) The evolution of GABA_A receptor like-genes. *Mol. Biol. Evol.* **24(2)**, 599-610.
142. Tretter V., Hauer B., Nusser Z., Mihalek R. M., Hoyer H., Homanics G. E., Somogyi P. y Sieghart W. (2001) Targeted disruption of the GABA_A receptor δ subunit gene leads to an up-regulation of $\gamma 2$ subunit-containing receptors in cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 10532-10538.
143. Ueda Y., Iwakabe H., Masu M., Suzuki M. y Nakanishi S. (1997) The mGluR6 5'upstream transgene sequence directs a cell-specific and developmentally regulated expression in retinal rod and ON-type cone bipolar cells. *J. Neurosci.* **17(9)**, 3014-3023.
144. Unwin N. (1995) Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature.* **73**, 37-43.
145. Uusi-Oukari M., Heikkila J., Sinkkonen S. T., Makela R., Hauer B., Homanics G. E., Sieghart W., Wisden W. y Korpi E. R. (2000) Long-range interactions in neuronal gene expression: evidence from gene targeting in the GABA_A receptor $\beta 2$ - $\alpha 6$ - $\alpha 1$ - $\gamma 2$ subunit gene cluster. *Mol. Cell. Neurosci.* **16**, 34-41.
146. Vandaele S., Nordquist D. T., Feddersen R. M., Tretjakoff I., Peterson A. C. y Orr H. T. (1991) Purkinje cell protein-2 regulatory regions and transgene expression in cerebellar compartments. *Genes and Development.* **5**, 1136-1148.
147. Verkhratsky A. y Butt A. (2008) Glial Neurobiology. England. John Wiley & Sons Ltd.
148. Wagstaff J., Chaillet J. R. y Lalande M. (1991) The GABA_A receptor $\beta 3$ subunit gene: characterization of a human cDNA from chromosome 15q11q13 and mapping to a region of conserved synteny on mouse chromosome 7. *Genomics.* **11**, 1071-1078.
149. Wagstaff J., Knoll J. H., Fleming J., Kirkness E. F., Martin-Gallardo A., Greenberg F., Graham Jr. J. M., Menninger J., Ward D., Venter J. C. y Lalande M. (1991) Localization of the gene encoding the GABA_A receptor $\beta 3$ subunit to the Angelman/Prader-Willi region of human chromosome 15. *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 330-337.
150. Wang W., Stock R. E., Gronostajski R. M., Wong Y. W., Schachner M. y Kilpatrick D. L. (2004) A role for nuclear factor I in the intrinsic control of cerebellar granule neuron gene expression. *J. Biol. Chem.* **279(51)**, 53491-53497.

151. Wässle H., Koulen P., Koulen P., Brandstätter J. H., Fletcher E. L. y Becker C. M. (1998) Glycine and GABA receptors in the mammalian retina. *Vision Research*. **38**, 1411-1430.
152. Watanabe S. I., Koizumi A., Matsunaga S., Stocker J. W. y Kaneko A. (2000) GABA-mediated inhibition between amacrine cells in the goldfish retina. *J. Neurophysiol.* **84**, 1826-1834.
153. Wegelius K., Pasternack M., Hiltunen J. O., Rivera C., Kaila K., Saarma M. y Reeben M. (1998) Distribution of GABA receptor rho subunits transcripts in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 350-357.
154. Weis L. y Reinberg D. (1992) Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. *FASEB J.* **6**, 3300-3309.
155. Whiting P. J. (2003) GABA_A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery?. *Drug. Discov. Today*. **8(10)**, 445-50.
156. Wilcox A. S., Warrington J. A., Gardiner K., Berger R., Whiting P., Altherr M. R., Wasmuth J. J., Patterson D. y Sikela J. M. (1992) Human chromosomal localization of genes encoding the γ 1 and γ 2 subunits of the γ -aminobutyric acid receptor indicates that members of this gene family are often clustered in the genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5857-5861.
157. Wilke K., Gaul R., Klauck S. M. y Poustka A. (1997) A gene in human chromosome band Xq28 (GABRE) defines a putative new subunit class of the GABA_A neurotransmitter receptor. *Genomics*. **45**, 1-10.
158. Wisden W., Laurie D. J., Monyer H. y Seeburg P. H. (1992) The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J. Neurosci.* **12**, 1040-1062.
159. Wu Y. y Cutting G. R. (2001) Developmentally regulated expression of GABA receptor rho1 and rho2 subunits, L7 and cone-rod homeobox (CRX) genes in mouse retina. *Brain Res.* **912**, 1-8.
160. Xuei X., Flury-Wetherill L., Dick D., Goate A., Tischfield J., Nurnberger J., Schuckit M., Kramer J., Kuperman S., Hesselbrock V., Porjesz B., Foroud T. y Edenberg H. J. (2009) GABRR1 and GABRR2, encoding the GABA-A receptor subunits rho1 and rho2, are associated with alcohol dependence. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* **2**, 418-27.
161. Yang C., Bolotin E., Jiang T., Sladek F. M. y Martinez E. (2007) Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene*. **389**, 52-65.

162. Young T. L. y Cepko C. L. (2004) A role for ligand-gated ion channels in rod photoreceptor development. *Neuron*. **41**, 867-879.
163. Zhang D. Z., Pan H., Zhang X., Brideau A. D. y Lipton S. A. (1995) Cloning of a gamma-aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92(25)**, 11756-11760.
164. Zhu J. J. y Lo F. S. (1999) Three GABA receptor-mediated postsynaptic potentials in interneurons in the rat lateral geniculate nucleus. *J. Neurosci.* **19**, 5721-5730.
165. Zigmond J. M. (1999) *Fundamental Neuroscience*. San Diego, California. Academic Press.

Anexo