



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS RECEPTORES QUIMÉRICOS
GABA ρ 1-pHL Y GABA ρ 2GFP

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
Q.F.B. ANA PATRICIA JUÁREZ MERCADO

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES
DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES INB-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. ALFONSO CÁRABEZ TREJO INB-UNAM
DR. MICHAEL CONRAD JEZIORSKI INB-UNAM

MÉXICO DICIEMBRE DEL 2014



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.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de Examen certificamos que la tesis elaborada por Ana Patricia Juárez Mercado, cuyo título es: “**Caracterización funcional de los receptores quiméricos GABA_p1-pHL y GABA_p2GFP**” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

FIRMAS

Presidente

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Secretario

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Vocal

Dra. Ana María Sifuentes Rincón

Suplente

Dra. Teresa Edith Garay Rojas

Suplente

Dr. Michael Conrad Jeziorski

Aprobado por el Comité Académico

Dr. Alfredo Varela Echavarría

Coordinador del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)

RESUMEN

Los receptores GABA ρ se distribuyen principalmente en la retina, específicamente en la terminal axónica de las neuronas bipolares donde participan en la modulación de la respuesta glutamatérgica. Sin embargo, se desconoce la maquinaria molecular y celular implicada en el direccionamiento, reclutamiento, anclaje y el tráfico intracelular de estos receptores hacia su sitio de acción.

Una de las herramientas empleadas para el seguimiento del tráfico de receptores de membrana *in vivo*, son las proteínas fluorescentes, por ejemplo la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*, por sus siglas en inglés). Tal ha sido su aplicación en el área biológica que se han generado variantes, como el caso de la *pHluorin* (pHL), la cual modifica la intensidad de su fluorescencia con cambios de pH en el ambiente celular.

Con el fin de visualizar la distribución celular de los receptores GABA ρ , en el presente trabajo se generaron receptores quiméricos los cuales se fusionaron a la GFP (GABA ρ 2) o la pHluorin (GABA ρ 1). En la primera parte del trabajo, se probó la funcionalidad de los receptores quiméricos mediante la técnica electrofisiológica de patch clamp en su configuración de célula completa. En células HEK293 observamos que en presencia de GABA se generan corrientes entrantes de rápida activación y lenta desensibilización, propiedades características de los GABA ρ . En la segunda parte, observamos que los receptores quiméricos generan proteínas fluorescentes en las líneas celulares HEK293 y STC-1 (Stanniocalcin-1, por sus siglas en inglés), permitiendo discernir la distribución de las vesículas fluorescentes que transportan al receptor.

El desarrollo de receptores quiméricos nos permitirá observar cómo se lleva a cabo el tráfico intracelular y cómo es regulada por la maquinaria molecular y celular, tanto en estado fisiológico como en patologías.

ABSTRACT

GABA ρ receptors are widely distributed in the retina, specifically at the axon terminal of bipolar cells, where they participate in the modulation of glutamatergic signaling. However, the molecular and cellular machinery involved in anchoring, distributing, recruiting and intracellular trafficking is unknown.

Fluorescent proteins can provide *in vivo* information about receptor dynamics and expression in living cells. The *green fluorescent protein* (GFP) is widely used as a non-invasive probe to study biological processes. The development of new GFP variants has opened novel applications for fluorescent labelling. One of them is the pH-sensitive GFP called *pHluorin* (pHL) that responds to changes in environmental pH.

We tagged GABA ρ receptors with either pHL or GFP to elucidate their dynamics and distribution. We observed that GABA ρ 1-pHL and GABA ρ 2GFP express fluorescent receptors in HEK293 and STC-1 cells allowing observation of the distribution of the fluorescent particles.

Functional properties of the tagged GABA ρ receptors were determined by the whole cell patch clamp technique. We observed that when either GABA ρ 1-pHL or GABA ρ 2GFP were expressed in HEK293 cells, GABA induced a current with a rapid activation and a slow desensitization.

Development of these chimerical receptors could allow researchers to determine how membrane trafficking is regulated in both health and disease.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su consejo y guía que fueron valiosos para llevar a cabo este proyecto. Enteramente agradecida.

Al Dr. Lenin David Ochoa de la Paz, por guiarme y aconsejarme.

Al Dr. Daniel Reyes Haro, al Dr. Carlos Saldaña, y a la Dra. Guadalupe Lorenzana, por su ayuda y enseñanza.

A nuestra Técnica Académica, M. en C. Ángeles Edith Espino Saldaña, al igual que nuestro Auxiliar de Laboratorio Efrén Ruíz Alcibar, por su invaluable ayuda durante la elaboración de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular II quienes me acompañaron en todo momento: Arturo Israel Machuca “Machuquín” Parra, Argel “Argelillo” Raúl Estrada Mondragón, Gustavo “Gustiviri” Martínez Delgado, Néstor “Nextdoor” Nivardo Jiménez Vargas, Fernando “Fher” Rosas Sánchez, Miriam “Miris” Edith Amaro Lara, Fernando Salomé “Salo” Elizondo, Abraham “A.B.” Rosas Arellano, Christian “Chris” Jovanny Valencia Guzmán, Adriana “Nana” Pétriz Reyes, Alejandra “Ale” González González, Jazmín “Jazz” Castellanos González, Elizabeth “Eli” Cabrera Ruiz, Teresa “Teresita” Leija, Ernesto “ME” Mora Loyola... Gracias por todo.

A mi Comité Tutoral, al Dr. Alfonso Cárabez Trejo y al Dr. Michael Jeziorski por sus valiosos comentarios y sugerencias en cada uno de los tutorales.

Al Jurado, Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo, Dr. Michael Conrad Jeziorski, Dra. Teresa Edith Garay Rojas, Dra. Ana María Sifuentes Rincón.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Becario No. 267849

Proyecto CONACYT No. 220224

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

Becario No. 509003302

DGAPA PAPIIT Proyecto 200913

A la Unidad de Proteogenómica.

Dra. Anaid Antaramian Salas

M. en C. Adriana González Gallardo

A la Unidad de Microscopía.

ISC. Elsa Nydia Hernández Ríos

A la Unidad de Enseñanza.

M. en C. Leonor Casanova Rico

A la Biblioteca.

Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela

Bib. Teresita de Jesús Pérez Cruz

MVZ Román Pacheco Barrita

DEDICATORIAS

A mi familia, María Guadalupe “Nany” Mercado García, Gerardo Patricio “Pato” Juárez Ramírez, y Leonardo “Lolo” Juárez Mercado porque sin ustedes no lo hubiera logrado.
Son mi pilar. El más importante.

ÍNDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Receptores a GABA.	2
2.2. Receptores GABA ρ .	2
2.3. Tráfico intracelular de receptores y su asociación a patologías neuronales.	9
2.4. Proteínas fluorescentes como trazadores intracelulares.	11
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVO GENERAL	16
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS	17
7.1. Construcción del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL.	17
7.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del fragmento GABA ρ 1-pHL.	18
7.1.2. Clonación del fragmento GABA ρ 1-pHL en pGEMT.Easy.	20
7.1.3. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> .	20
7.1.4. Aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina.	20
7.1.5. Clonación del fragmento GABA ρ 1-pHL en pcDNA3.	21
7.2. Caracterización funcional de los receptores quiméricos GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP en la línea celular HEK293.	23
7.3. Inmunolocalización de los receptores GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en la línea celular STC-1.	24
7.4. Determinación de la distribución de los receptores quiméricos GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP en la línea celular STC-1.	24

8. RESULTADOS	26
8.1. Construcción del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL.	26
8.2. Expresión del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL en células HEK293.	30
8.3. Inmunolocalización de los receptores GABA ρ 1 y ρ 2 en células STC-1.	32
8.4. Expresión de los receptores quiméricos GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP en células STC-1.	34
8.5. Expresión funcional de GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP en células HEK293.	37
9. DISCUSIÓN	38
10. CONCLUSIONES	41
11. PERSPECTIVAS	41
12. REFERENCIAS	42
13. LISTA DE FIGURAS	53
14. LISTA DE TABLAS	55

1. INTRODUCCIÓN

La transmisión sináptica a través de receptores ionotrópicos juega un papel importante en el funcionamiento del sistema nervioso central. Estos receptores contienen un sitio de unión al ligando y un poro selectivo al ion en particular que permite modificar las concentraciones iónicas de las neuronas en cuestión de milisegundos. El mecanismo de la inhibición sináptica se lleva a cabo cuando se despolariza la terminal presináptica, el neurotransmisor es liberado de las vesículas sinápticas, difunde por el espacio sináptico y se une a los receptores que se encuentran en la terminal postsináptica, permitiendo la apertura de los mismos y por consiguiente, el paso de los iones cloruro para los receptores de GABA y Glicina (Enz, 2001; Kandel et al., 2000).

El neurotransmisor inhibitorio más abundante en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados es el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Martin y Olsen, 2000) y la activación de sus receptores conlleva a la inhibición de la transmisión sináptica. Durante el desarrollo, y en algunos estados patológicos, este neurotransmisor es excitatorio y participa en la maduración de las neuronas (Ben-Ari, 2002).

El GABA actúa en dos tipos de receptores: 1) los *ionotrópicos*, entre los que se encuentran el GABA_A y el GABA_p, y 2) los *metabotrópicos*, representados por el receptor GABA_B. Las propiedades estructurales y farmacológicas, difieren entre los tres receptores (Chebib, 2004; Huang et al., 2006; Olsen y Sieghart, 2008; Olsen y Sieghart, 2009; Polenzani et al., 1991; Qian y Ripps, 2009).

Los receptores GABA_p fueron descritos inicialmente en la retina (Enz, 2001; Lukasiewicz et al., 2004; Polenzani et al., 1991), específicamente en la terminal axónica de las neuronas bipolares, donde participan en la inhibición presináptica y en la modulación de la respuesta glutamatérgica (Sagdullaev et al., 2006). Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares implicados en su direccionamiento desde y hacia el axón no han sido completamente elucidados.

2. ANTECEDENTES

2.1. Receptores a GABA

El GABA es un neurotransmisor que se encuentra en abundancia en el SNC, y es esencial en el mantenimiento del balance de la excitación e inhibición neuronal (Chebib, 2004). La síntesis de este neurotransmisor se lleva a cabo a partir de la actividad de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), removiendo el grupo α -carboxilo del aminoácido glutamato (Iversen et al., 2009).

Los receptores GABA_A son pentámeros constituidos por subunidades heteroméricas (α , β , γ , δ , ϵ , π ó θ) (Watanabe et al., 2002); son bloqueados por bicuculina y modulados por barbituratos, neuroesteroides y benzodiazepinas (Bormann, 1988; Macdonald y Olsen, 1994). Los receptores GABA_p son pentámeros compuestos por tres subunidades diferentes denominadas ρ 1, ρ 2 y ρ 3 (Bormann y Feigenspan, 2001; Martínez-Delgado et al. 2010). Son insensibles a la bicuculina y al baclofeno, inhibidores de los receptores GABA_A y GABA_B, respectivamente (Chebib, 2004; Polenzani et al., 1991). Sin embargo, GABA_p es sensible a el TPMPA (ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il metilfosfónico) (Bormann, 2000; Murata, 1996; Ragozzino et al. 1996).

2.2. Receptores GABA_p

Los genes que codifican para las subunidades GABA_p son: GABRR1, GABRR2 y GABRR3. Los dos primeros se encuentran localizados en tándem en el cromosoma 6 humano, y se encuentran en un locus asociado a desórdenes visuales hereditarios (Ruiz et al., 1998), mientras que el gen GABRR3 se encuentra en el cromosoma 3q11-q3.3. (Bailey et al., 1999).

Esta distribución cromosómica, junto con su secuencia nucleotídica, sugieren que los genes que codifican para las subunidades que conforman al receptor GABA_p tienen un gen ancestral común con los genes que codifican para las subunidades del receptor

GABA_A, diversificándose en etapas tempranas de la evolución de los cordados hasta localizarse en diferentes cromosomas (Bailey et al., 1999). Las subunidades presentan una similitud aminoacídica de un 30-38% con respecto a las otras subunidades de GABA_A (Cutting et al., 1992). Las subunidades $\rho 2$ y $\rho 3$ comparten un 63-74% de homología aminoacídica con la subunidad $\rho 1$, respectivamente (Cutting et al., 1992; Olsen y Tobin, 1990; Wang et al., 1994).

Estructuralmente (*Figura 1*), los receptores GABA_A son miembros de la familia de canales iónicos activados por ligando (LGIC, *ligand-gated ion channels*, por sus siglas en inglés) (Miller y Aricescu, 2014; Olsen y Sieghart, 2009). Están conformados por cinco subunidades formando así un pentámero; cada pentámero posee 4 pases transmembranales (TM1-TM4). El segundo pase transmembranal (TM2) de cada una de las subunidades forman el poro que permite el paso de los iones cloruro. Presentan un extenso amino terminal (N-terminal), y un pequeño dominio carboxilo terminal (C-terminal); ambos se encuentran en la cara extracelular con respecto a la membrana celular. En el interior, se encuentran dos asas; la segunda une al TM3 y TM4 y se piensa que regula la localización, el anclaje y reclutamiento de los receptores en la membrana plasmática de las neuronas, así como la posibilidad de interacciones con proteínas del citoesqueleto (Qian y Ripps, 2009).

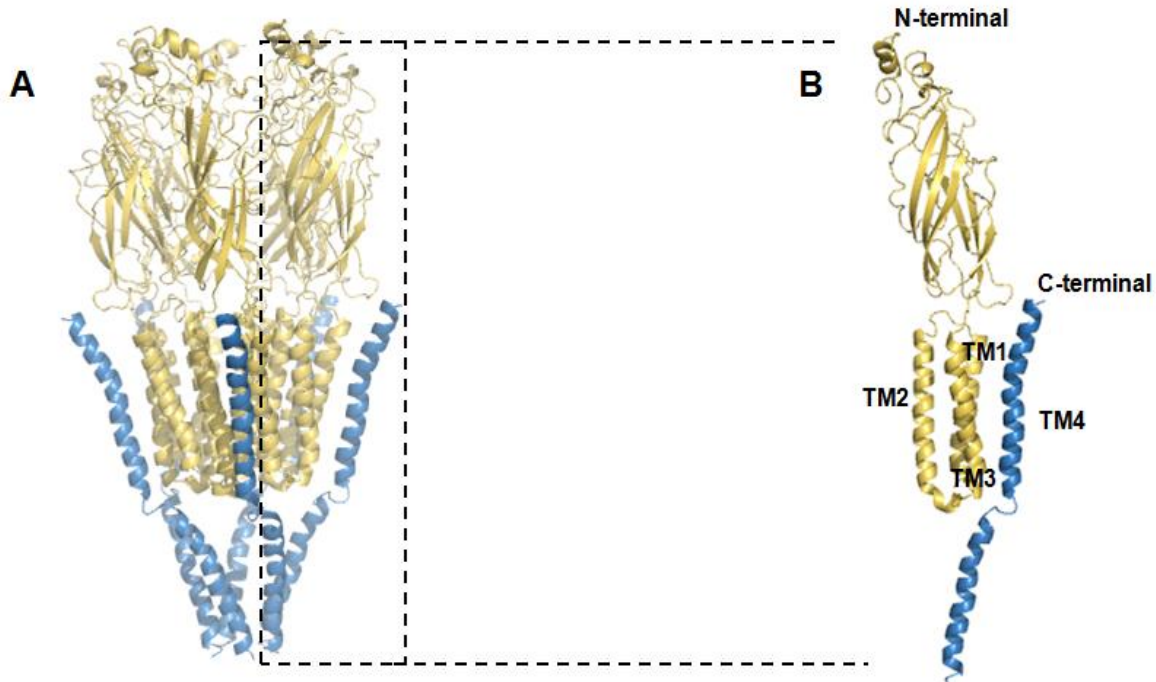


Figura 1. Modelo estructural del receptor GABA ρ . En el esquema A, se muestra las subunidades que conforman al receptor pentamérico. Cada una de las subunidades (Esquema B), presenta 4 pases transmembranales (TM1-TM4), el extremo amino terminal (N-terminal), el extremo carboxilo terminal (C-terminal), y un asa intracelular entre el TM3 y TM4 (Modificado de Estrada-Mondragón et al., 2010).

Los receptores GABA ρ conforman receptores homoméricos funcionales (Cutting et al., 1991), aunque probablemente formen receptores heteroméricos *in vivo* (Enz y Cutting, 1999; Ogurusu et al., 1999; Ogurusu y Shingai, 1996). Sin embargo, cuando se expresan en sistemas heterólogos, como ovocitos de *X. laevis* (Polenzani et al., 1991) o en las células de mamífero HEK293 (Alakuijala et al., 2005; Filippova et al., 1999), cada una de las subunidades GABA ρ forma receptores que generan una corriente aniónica, que desensibiliza lentamente (*Figura 2*) y que es resistente a la bicuculina y es antagonizada por el TPMPA (ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il metilfosfínico) (Ragozzino et al., 1996; Shimada et al., 1992).

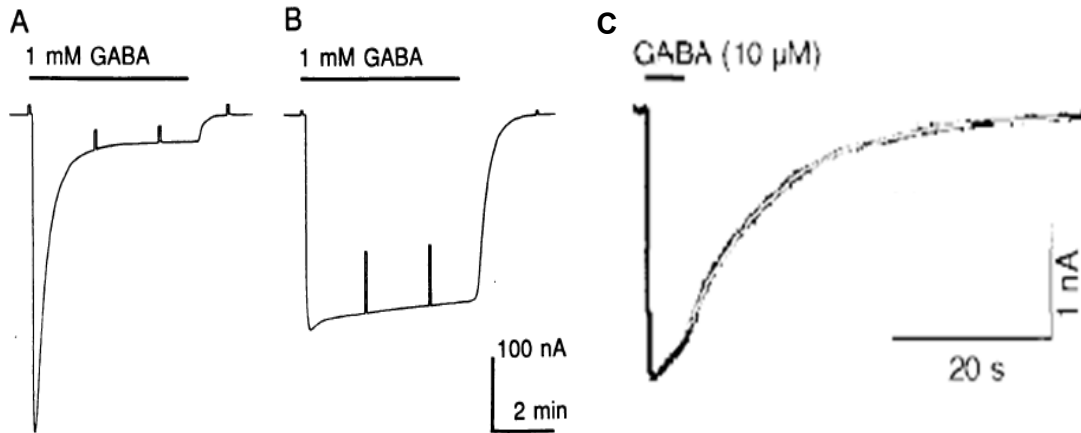


Figura 2. Corrientes generadas por GABA ρ en ovocitos de *X. laevis* y en células HEK293. El registro A corresponde al ovocito inyectado con RNAm de corteza bovina; se observa una corriente característica de los receptores GABA. El registro B corresponde a un ovocito inyectado con el RNAm de retina bovina, observándose una corriente característica de los receptores GABA ρ (Polenzani et al., 1991). El registro C corresponde a la corriente generada por el receptor GABA ρ 1 humano expresado en células HEK293 obtenida mediante la técnica de patch-clamp (Filippova et al., 1999).

Las características de los receptores GABA ρ fueron definidas a través del registro electrofisiológico en ovocitos de *X. laevis* inyectados con el RNAm de retina (Polenzani et al., 1991), y han sido estudiados extensivamente en la retina de varias especies, por ejemplo, en la rata (Feigenspan et al., 1993; Feigenspan y Bormann, 1994; Feigenspan y Bormann, 1998; Fletcher et al., 1998; Pan y Lipton, 1995), el ratón (McCall et al., 2002), el conejo (McGillem et al., 2000) y la salamandra (Lukasiewicz et al., 1994). Se encuentran principalmente en neuronas bipolares, donde ejercen su acción en la terminal axónica y se encuentran segregados física y funcionalmente de los receptores GABA ρ , como se observa en la *Figura 3* (Lukasiewicz et al., 2004; Sagdullaev et al., 2006; Varela et al., 2005).

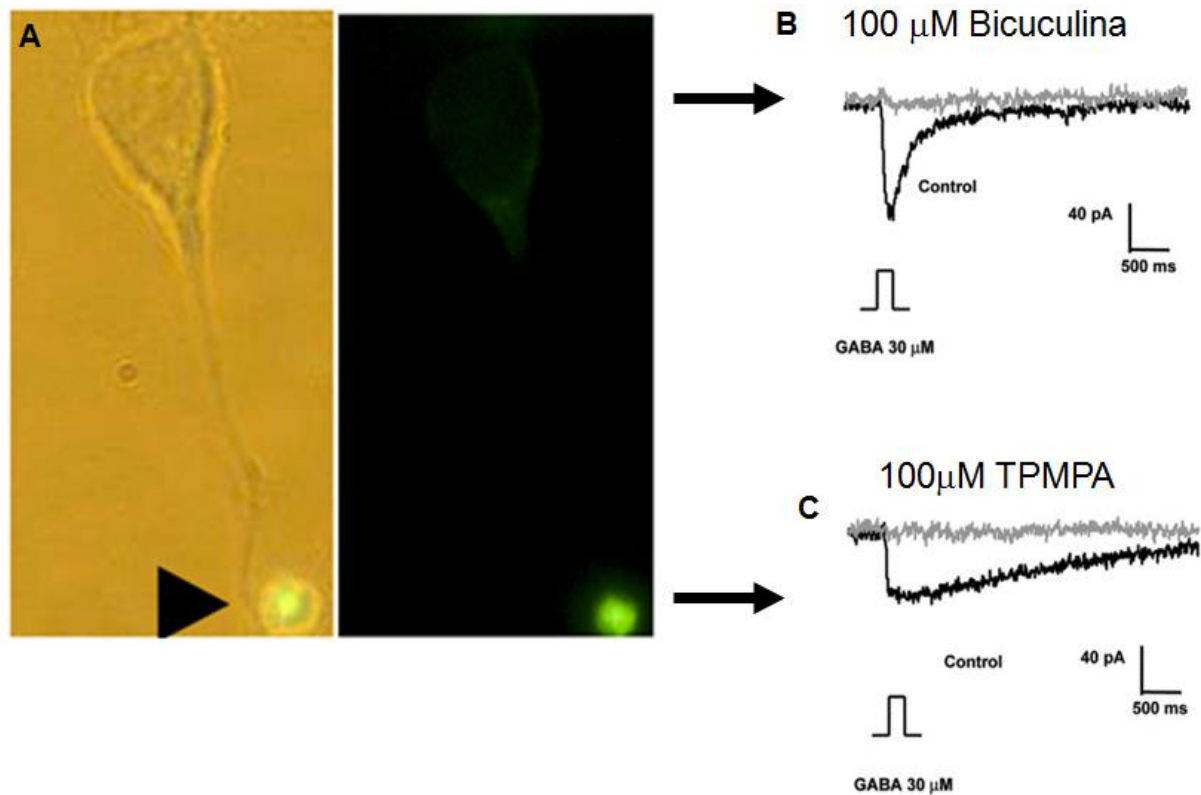


Figura 3. Inmunolocalización del receptor GABA ρ en neuronas bipolares. En la imagen A, la cabeza de flecha indica la localización del receptor, principalmente en la terminal del axón. Ésta fue ubicada mediante inmunofluorescencia en células permeabilizadas (Martínez-Delgado et al., 2011). **Corrientes generadas por receptores a GABA en neuronas bipolares.** El registro B muestra una corriente generada por los receptores GABA $_A$, la cual es bloqueada por su antagonista específico, bicuculina. El registro C muestra una corriente generada en el axón de la neurona bipolar, que es una corriente característica de los receptores GABA ρ , la cual es bloqueada con su antagonista específico, TPMPA (Varela et al., 2005).

Los receptores GABA ρ juegan un papel fundamental en la vía visual. En la retina, se encuentran en la terminal axónica de la neurona bipolar donde se lleva a cabo la inhibición presináptica modulando la respuesta excitatoria entre las neuronas bipolares y las neuronas ganglionares, como se muestra en la *Figura 4*.

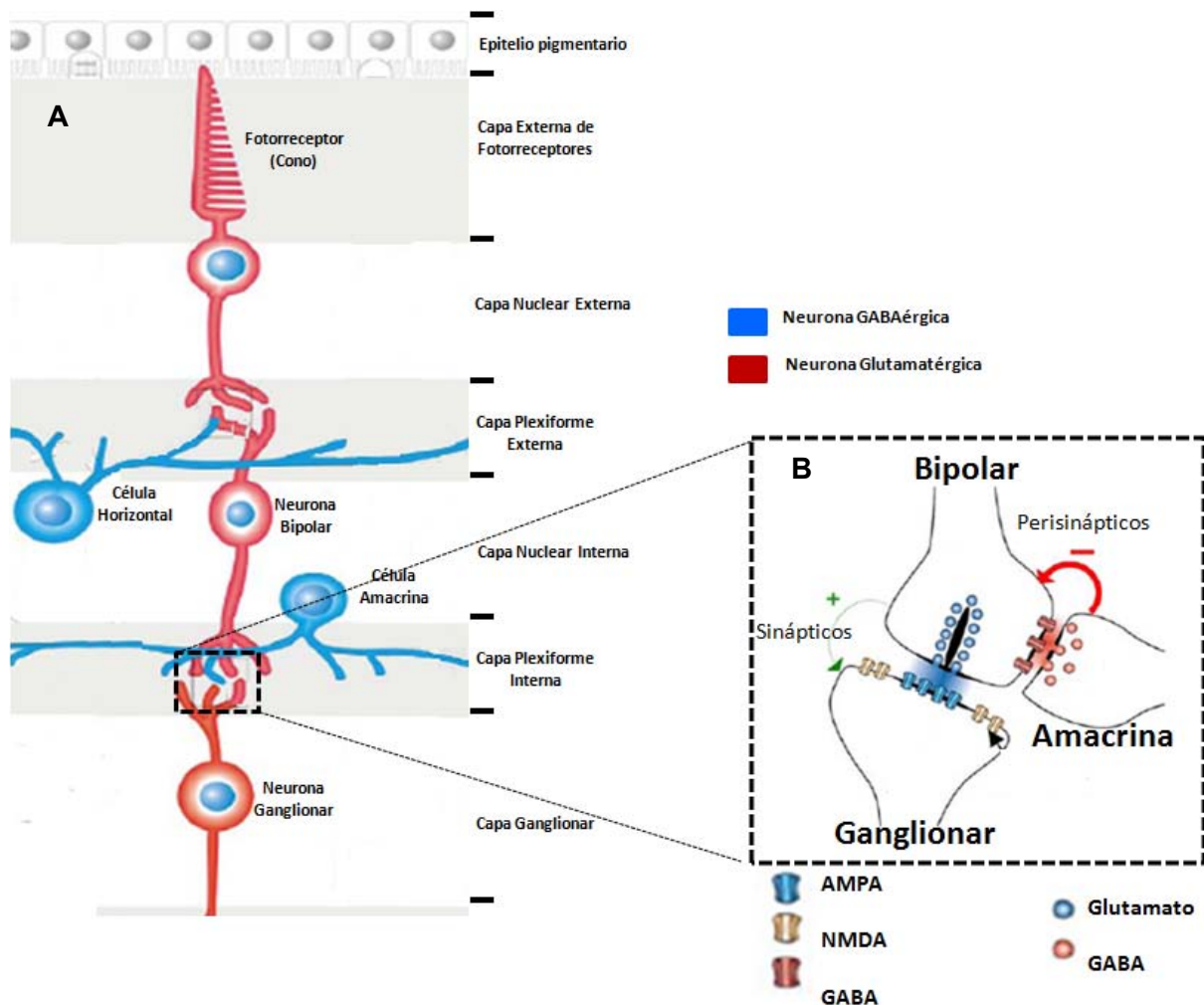


Figura 4. Organización celular de la retina en vertebrados. La imagen A, muestra las 5 poblaciones neuronales principales en el sistema visual: fotorreceptores (conos y bastones), células horizontales, células bipolares, células amacrinas y células ganglionares. **Participación del receptor GABA ρ en la modulación de la respuesta glutamatérgica.** En la imagen B, se observa al receptor GABA ρ en la terminal axónica de la neurona bipolar, activados por GABA liberado por las células amacrinas, modulando la respuesta glutamatérgica que activa a los receptores de AMPA que se encuentran en la célula ganglionar (Modificado de Sagdullaev et al., 2006; Xiong-Li Yang, 2004).

La expresión del receptor GABA ρ no se limita únicamente a la retina. Existe evidencia de la amplia distribución de las subunidades $\rho 1$ y $\rho 2$ en el sistema nervioso central, específicamente en el cerebelo, el núcleo caudado, el cuerpo calloso, el puente y el bulbo

raquídeo (López-Chávez et., 2005; Rosas-Arellano et al., 2007). En tejidos periféricos, se ha reportado que los receptores GABA ρ se encuentran distribuidos en el testículo (Li et al., 2008), el ovario, el intestino, la glándula adrenal, el útero y la placenta (Akinci y Schofield, 1999; Rozzo et al., 2002).

2.3. Tráfico Intracelular de Receptores y su Asociación a Patologías Neuronales

La inhibición sináptica juega un papel crítico en la regulación de la excitabilidad neuronal y en el procesamiento de la información en el cerebro. El número de receptores en la superficie de la membrana neuronal y en la sinapsis es determinante para llevar a cabo esta regulación (Arancibia-Carcamo y Kittler, 2009; Jacob et al., 2008). La maquinaria molecular implicada en el reclutamiento y envío de los receptores ionotrópicos a GABA hacia la sinapsis no ha sido elucidada por completo, aunque sí se ha avanzado, particularmente, por lo que respecta, a las subunidades $\alpha 1$ y $\gamma 2$.

Existen antecedentes donde señalan que proteínas asociadas al citoesqueleto, como la MAP1B, permiten el anclaje de GABA ρ 1 en la membrana plasmática (Billups et al., 2000; Hanley et al., 1999). Sin embargo, los ratones *knock-out* para el gen que codifica a la MAP1B, no presentan modificaciones en el patrón de distribución del receptor GABA ρ en las neuronas bipolares de la retina (Meixner et al., 2000). Por lo tanto, la interacción entre el GABA ρ y la MAP1B, sigue siendo un tema en controversia. En otros trabajos se determinó que el receptor GABA ρ se internaliza por endocitosis mediada por eventos de fosforilación dependientes de cinasas de proteínas, y esta fosforilación no se lleva a cabo directamente en el receptor (Filippova et al., 1999).

Se sabe que el receptor GABA A interacciona con proteínas asociadas a citoesqueleto, con otras proteínas de señalización y con aquellas que le permiten ensamblarse adecuadamente (Jacob et al., 2008). Por mencionar algunas, se conoce que la proteína GABARAP (Mohrlüder et al., 2009; Wang et al., 1999), y la Geferina (Jacob et al., 2005; Levi et al., 2004), son necesarias para la acumulación del receptor GABA A en la membrana plasmática. Ambas interactúan con la subunidad $\gamma 2$ y con los filamentos de tubulina.

Otro reporte menciona que la interrupción del complejo entre la proteína motora 5 de la familia de las kinesinas (KIF5), y la proteína 1 asociada a la huntingtina (HAP1), reduce el número de receptores GABA A en la sinapsis y altera las características electrofisiológicas de estos receptores (Twelvetrees et al, 2010).

Alteraciones en el tráfico de GABA_A hacia la membrana plasmática generan varias enfermedades neurales (Jacob et al., 2008; Olkkonen y Ikonen, 2006). Estas alteraciones inducen la pérdida del balance excitatorio/inhibitorio consecuentemente afectando la transmisión sináptica.

Por ejemplo, en el caso de las epilepsias generalizadas de origen febril (GEFS+), se han asociado a mutaciones en el gen que codifica para la subunidad $\gamma 2$; estas impiden el transporte eficiente del receptor hacia la membrana plasmática (Kang et al., 2006). En otro estudio, se demostró que casos de epilepsia mioclónica juvenil se debían a una mutación en la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A, que conlleva a la reducción del número de receptores en su presencia en la membrana plasmática debido a su retención en el retículo endoplásmico (Gallagher et al., 2005).

Otros estudios demostraron que mutaciones en los genes que codifican para las subunidades del receptor GABA_A, ocasionan alteraciones en el plegamiento de la proteína, la estabilidad del receptor y la oligomerización de las subunidades, además de la disminución en el tráfico del receptor y alteraciones en sus propiedades funcionales (MacDonald et al., 2010).

Estos antecedentes evidencian que el direccionamiento preciso de los receptores a GABA es determinante para que estos funcionen apropiadamente en el SNC. Modificaciones en este proceso tienen como consecuencia estados patológicos. Por ello, es importante determinar cuáles son los mecanismos celulares y moleculares que regulan el tráfico de neuroreceptores.

2.4. Proteínas Fluorescentes como Trazadores Intracelulares

A partir del descubrimiento de la GFP, esta se ha empleado como un marcador en el seguimiento de la expresión de genes, localización y tráfico intracelular de proteínas (Figura 5, Chalfie, 1995; Gerdes y Kaether, 1996).

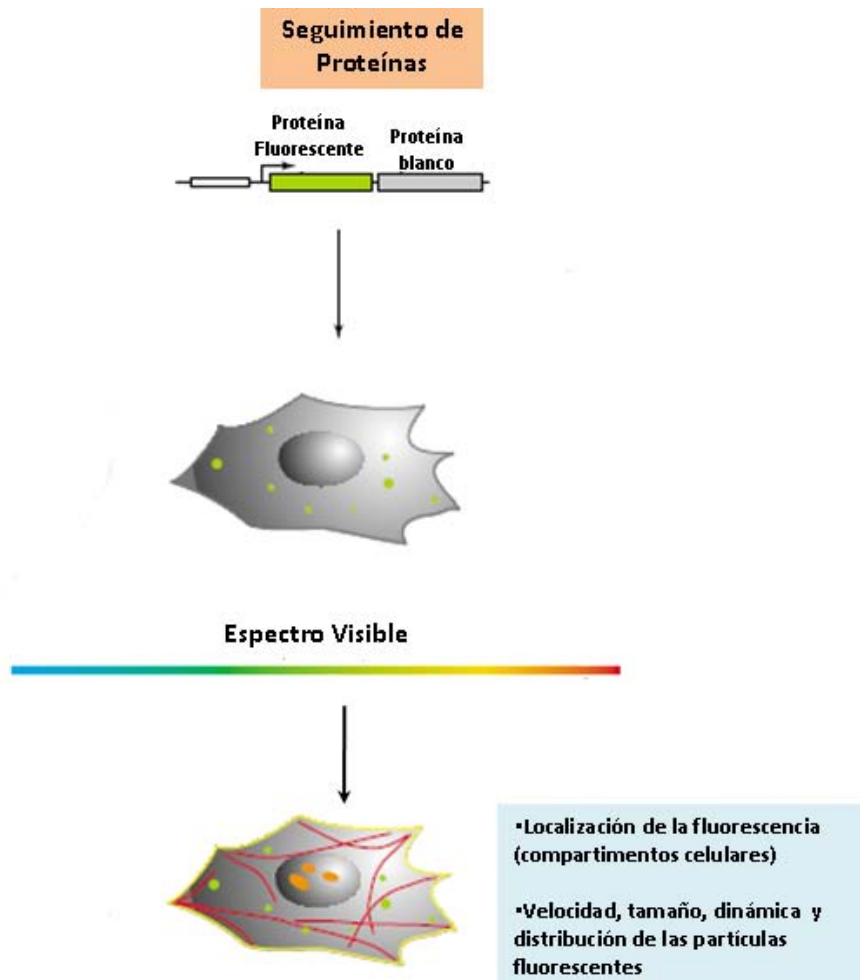


Figura 5. Aplicaciones de las proteínas fluorescentes en sistemas *in vivo* (Modificado de Chudakov et al., 2005).

Se han generado múltiples variantes de esta proteína alterando sus propiedades fisicoquímicas. Durante los últimos años, ha sido caracterizada la diversidad espectral de proteínas similares a la GFP abarcando por completo el espectro visible, donde cada variante presenta características bioquímicas específicas. En el desarrollo de múltiples variantes fluorescentes se incluyen aquellas que son fotoactivables, sensores de calcio y cloruro, y las que responden a las condiciones del microambiente, como el pH (Chudakov et al., 2005). Este último caso, corresponde a la variante conocida como la *pHluorin* (*pHL*) (Miesenböck et al., 1998; Sankaranarayanan et al., 2000).

La *pHL* fue diseñada para la visualización de los procesos de exocitosis, reciclaje y secreción de vesículas (Kneen et al., 1998), ya que por ejemplo, trabajos realizados por Miesenböck y colaboradores en 1998, muestran que el pH en el lumen de la vesícula sináptica es de ~5.6 y una vez que esta vesícula se ha fusionado en la membrana plasmática, el pH aumenta abruptamente a valores más alcalinos, correspondientes al ambiente extracelular (~7.4) (*Figura 6*).

La *pHL* se ha aplicado en el estudio del tráfico selectivo de neuroreceptores como los receptores glutamatérgicos de la familia AMPA, los cuales se ha determinado que después de insertarse en la membrana plasmática, difunden lateralmente (Ashby et al., 2006). También, se ha observado a través del estudio de estos receptores fusionados a la *pHL* su dinámica en el proceso de endocitosis (Ashby et al., 2004), y su direccionamiento hacia la membrana plasmática (Yudowski et al., 2007).

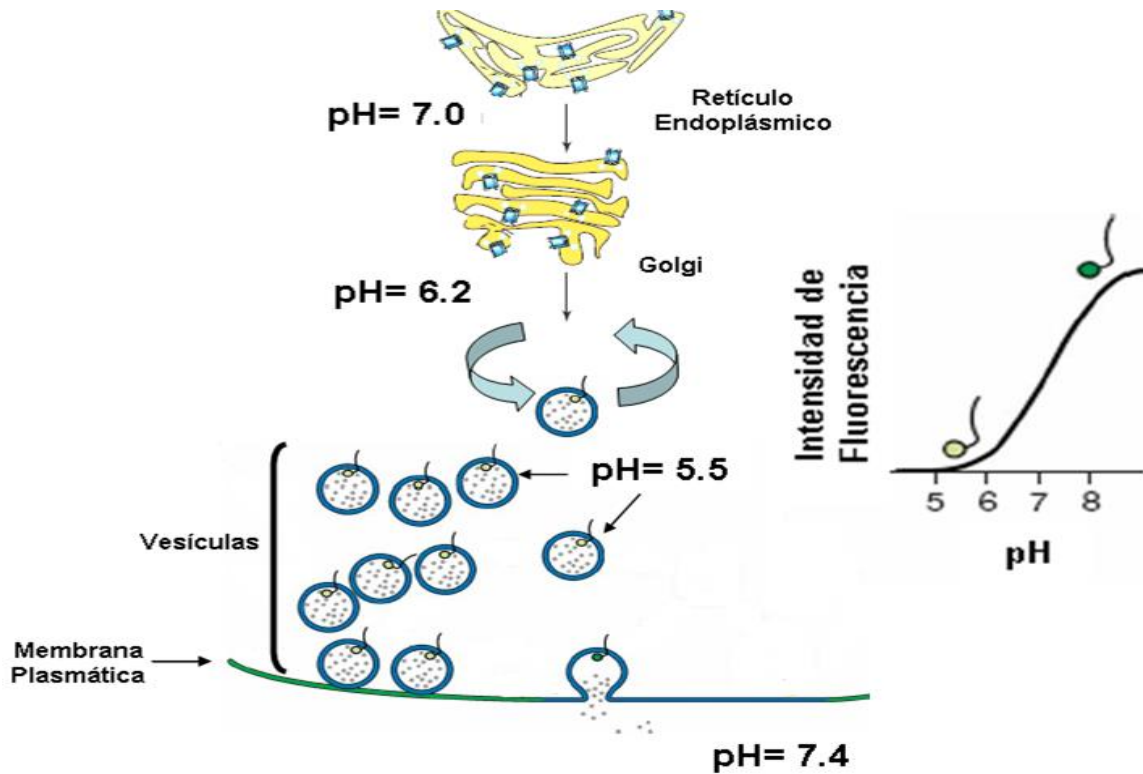


Figura 6. Vía de tráfico de un receptor de membrana acoplado a la proteína fluorescente *pHluorin* (pHL). En los diferentes compartimentos celulares existen diferencias en el pH, lo cual afecta la intensidad de la fluorescencia de la pHL, incrementando a valores alcalinos (pH=7.4) correspondiente al ambiente extracelular una vez que la proteína se inserta en la membrana plasmática (Modificado de Ashby et al., 2004 y Burrone et al., 2007).

Tomando en cuenta las características de las proteínas fluorescentes, se podrían utilizar como indicadores en el tráfico de proteínas a través de los compartimentos celulares. Por tal motivo, el generar receptores quiméricos GABA ρ fusionándolos a la GFP o a su variante, la pHL, serían empleados ampliamente para visualizar la trayectoria de estas proteínas, descifrar su tráfico intracelular y su ruta de anclaje en la membrana plasmática.

En este trabajo se decidió iniciar el estudio de la localización de los receptores quiméricos en las células STC-1 (*Figura 7*). Esta línea celular expresa constitutivamente al receptor GABA ρ (Jansen et al., 2000), y recientemente descrito, al receptor GABA α , éstos últimos activados por taurina y sus análogos (Glassmeier et al., 1998; Reyes-Haro et al., 2014). Debido a estas características, estas células servirán como modelo experimental para comenzar a entender el tráfico selectivo de los receptores GABA ρ .

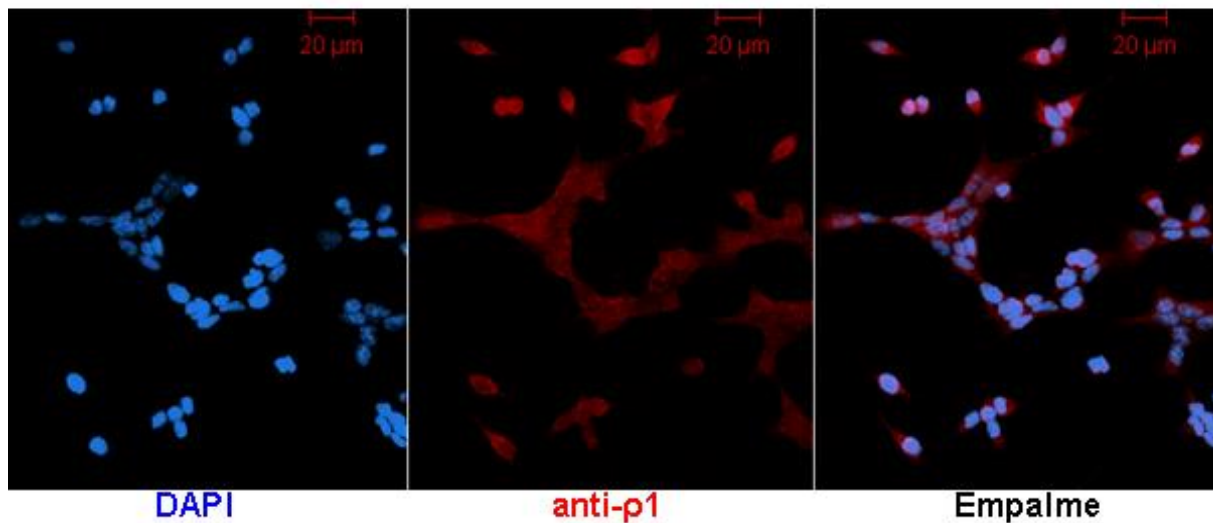


Figura 7. Inmunolocalización del receptor GABA ρ 1 en células STC-1 permeabilizadas. Barra= 20 μ m (Rosas-Arellano, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Los receptores GABA ρ fueron inicialmente descritos en la retina y existe evidencia molecular de su distribución en el SNC en estructuras como el núcleo caudado, el cuerpo calloso, el puente, el bulbo raquídeo, el cerebelo (López-Chávez et al., 2005; Martínez-Delgado et al., 2010; Rosas-Arellano et al., 2007).

También se ha documentado que en ciertas patologías neurales, por ejemplo las epilepsias generalizadas de origen febril (GEFS+), alteran el transporte de los receptores GABA α hacia la membrana plasmática (Kang et al., 2006), o son retenidas en el retículo endoplásmico (Gallagher et al., 2005). Por esta razón, es importante entender las vías de tráfico de estos receptores para comprender las alteraciones de estas patologías a nivel celular y molecular, además de entender los mecanismos básicos del tráfico selectivo hacia la membrana plasmática.

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo generar y caracterizar receptores quiméricos entre GABA ρ y proteína fluorescentes expresados en células de mamífero mediante técnicas electrofisiológicas y de fluorescencia.

4. HIPÓTESIS

Los receptores quiméricos GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP formarán receptores funcionales en las líneas celulares HEK293 y STC-1.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar funcionalmente y determinar la distribución celular de los receptores quiméricos GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construir la quimera GABA ρ 1-pHL.
2. Caracterizar funcionalmente los receptores quiméricos GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP en células HEK293.
3. Determinar la distribución de los receptores quiméricos GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP en células STC-1.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Construcción del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL.

Para generar el receptor quimérico GABA ρ 1-pHL, se obtuvieron los fragmentos que codifican para el receptor GABA ρ 1 y la proteína fluorescente pHL, tal como se observa en la *Figura 8*.

El fragmento que codifica para GABA ρ 1 se obtuvo del plásmido pDG1- ρ 1 mediante restricción enzimática, donde en el extremo 5' fue incorporado un sitio de reconocimiento para la enzima *Bam* HI, y en el extremo 3' fue removido el codón de paro e incorporado un sitio de reconocimiento para la enzima *Not* I.

El fragmento que codifica para la pHL, fue obtenido del plásmido pGEMT.Easy al cortar con las enzimas de restricción *Not* I y *Xho* I, cuyos sitios de reconocimiento fueron incorporados para estas enzimas en el extremo 5' y 3', respectivamente.

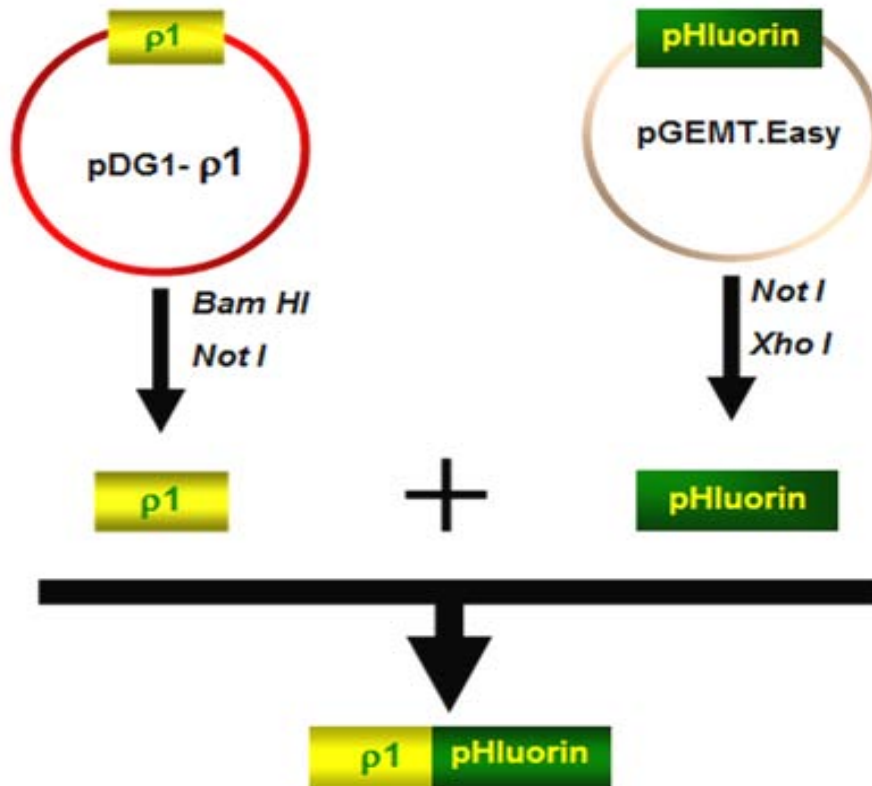


Figura 8. Estrategia para la construcción de la fusión GABA ρ 1-pHL.

7.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del fragmento GABA ρ 1-pHL.

Después de la ligación, se procedió a amplificar el producto de la fusión de GABA ρ 1 y pHL, por el método de *reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*, sus siglas en inglés). Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos (*Tabla 2*), que hibridan en el gen que codifica el fragmento GABA ρ 1-pHL, esperando una banda de 2,194 pb. Las condiciones de la reacción, así como de termociclado, se observan en las *Tabla 3 y 4*, respectivamente. El fragmento obtenido de la amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, se comparó con un marcador de peso molecular (Gene Ruler® DNA Ladder, Fermentas), y se observó bajo luz UV.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación del fragmento GABA ρ 1-pHL.

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA	TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR
<i>CVG2For</i>	5' GGATCCCGAGAAGGATGTTTGAATTTG 3'	2,194 pb
<i>SEPpHRev</i>	5' CTCGAGTTATTTGTATAGTTCAT 3'	

Tabla 2. Condiciones para la reacción de PCR

COMPONENTES	VOLUMEN (Vf = 25 µL)
Buffer p/PCR sin Mg ⁺² 10X	2.5 µL
MgCl ₂ 50mM	0.75 µL
dNTP's 10 mM	0.5 µL
Oligo 5' CVG2For 2.5 µM	2 µL
Oligo 3' SEPpHRev 2.5 µM	2 µL
DNA 10 ng/ µL	2 µL
Taq Pol 5U/ µL	0.5 µL
H ₂ O	cbp

Tabla 3. Condiciones de amplificación del fragmento GABAp1-pHL.

	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94° C	1:00 min	1
Desnaturalización	94° C	0:30 seg	
Alineamiento	53° C	0:30 seg	27
Extensión	72° C	2:30 min	
Extensión final	72° C	5:00 min	1

7.1.2. Clonación del fragmento GABA ρ 1-pHL en el plásmido pGEMT.Easy.

Para clonar el fragmento GABA ρ 1-pHL en el plásmido pGEMT.Easy, se procedió a obtener el producto de PCR de 2.1 Kb del gel de agarosa.

El fragmento de 2.1 Kb fue aislado del gel de agarosa mediante un kit comercial (*GE Healthcare Illustra GFX*[®]). Se analizó el producto mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, comparándolo con un marcador de peso molecular (Gene Ruler[®] DNA Ladder, Fermentas), y se observó bajo luz UV.

7.1.3. Transformación de bacterias *E. coli*.

Para la obtención de la clona pGEMT.Easy-GABA ρ 1-pHL, se utilizó la ligación (*Tabla 5*) para transformar bacterias competentes *E. coli* (XL1-Blue). Para ello, se incubó durante 30 min, en hielo y después, se le dio un choque térmico a 42° C durante 90 seg. Posteriormente, se añadió 950 μ L de medio LB y se dejaron las células incubando durante 2 h a 37° C con agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a sembrar 200 μ L de las células transformadas en una caja Petri con medio LB y Ampicilina (100 μ g/mL). Se incubó a 37° C durante 12 h. Se seleccionaron las colonias que crecieron en la placa para ser inoculadas en tubos con 4 μ L de medio LB con Ampicilina (100 μ g/mL). Estos tubos se incubaron a 37° C durante 12 h.

7.1.4. Aislamiento de ADN plasmídico por lisis alcalina.

Después de la incubación de los tubos con la clona pGEMT.Easy-GABA ρ 1-pHL, se procedió a obtener el ADN plasmídico mediante la técnica de lisis alcalina (Sambrook y Rusell, 2001).

Se recolectaron las células centrifugando los tubos a 13,000 rpm (*Sorvall Heraeus*[®], número del rotor #3328) a 4° C durante 1 min. El sobrenadante fue retirado y se resuspendió en 200 μ L de la *Solución I* (Tris Cl 25 mM, pH= 8.0; EDTA 10 mM, pH=8.0), para dejarse incubando durante 5 min. Después, se adicionó 200 μ L de la *Solución II* de

lisis alcalina (NaOH 10 N, SDS 10%), y se incubó durante 5 min. La mezcla fue neutralizada con 200 μ L de la *Solución III* (Acetato de Potasio 5M, Ácido Acético 3M), y se incubó durante 10 min en hielo. La mezcla fue centrifugada a 13,000 rpm a 4° C durante 10 min, recolectando el sobrenadante en otro tubo limpio y estéril, agregando 0.6 volúmenes de Isopropanol puro para, nuevamente, centrifugar la muestra a 13,000 rpm a 4° C durante 10 min. La pastilla se lavó con 500 μ L de Etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm a 4° C durante 7 min; el sobrenadante fue removido, y la pastilla se dejó secar. La pastilla fue resuspendida en un volumen de 30 a 50 μ L de H₂O MQ estéril con RNasa (20 μ g/mL).

El ADN plasmídico fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y observado bajo luz UV.

7.1.5. Clonación del fragmento GABA ρ 1-pHL en pcDNA3.

Una vez analizado el ADN plasmídico, el fragmento GABA ρ 1-pHL fue liberado del plásmido pGEMT.Easy por enzimas de restricción (*Bam HI* y *Xho I*), y se clonó en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen®).

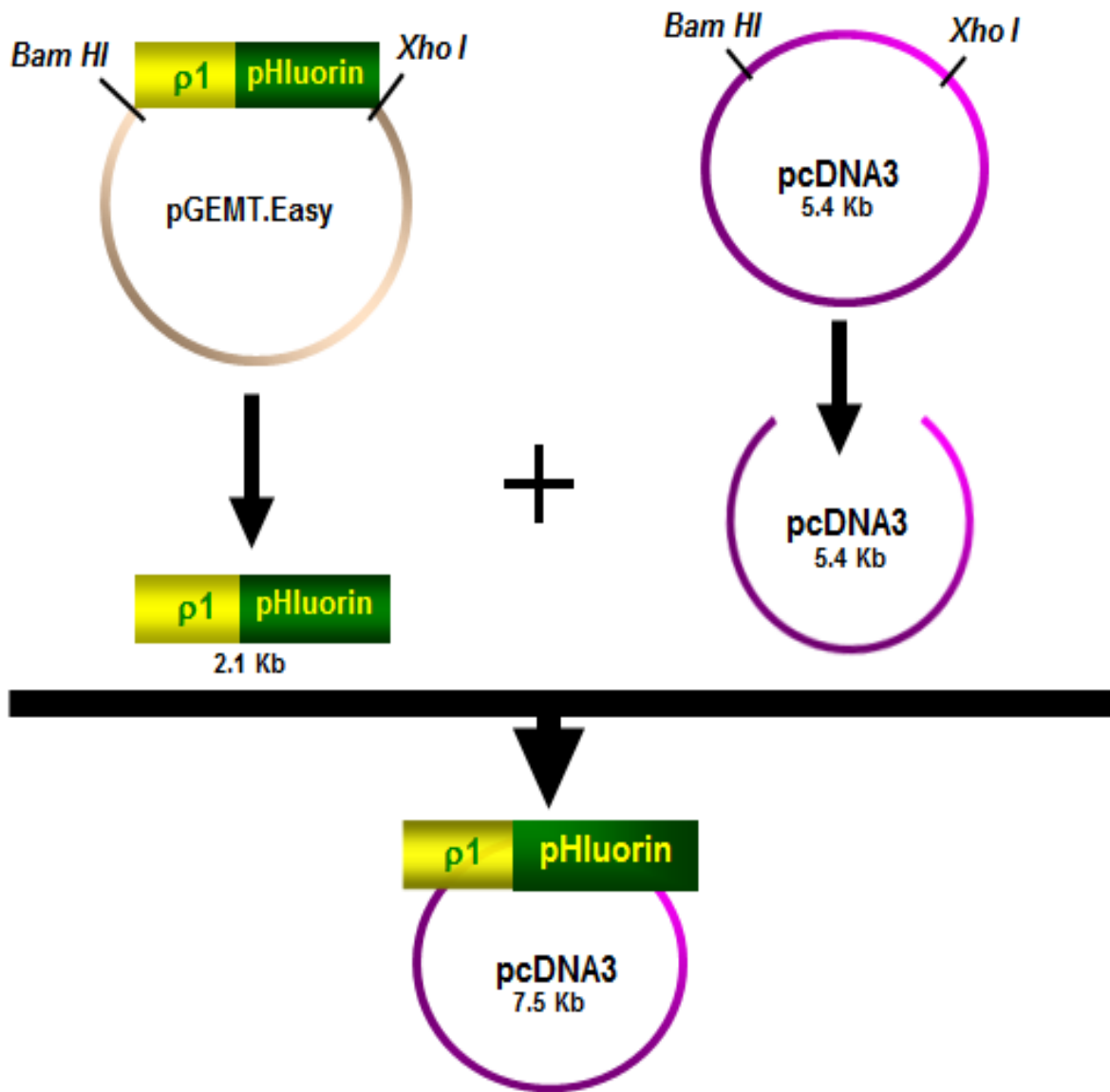


Figura 9. Esquema experimental de la clonación del fragmento *GABA ρ 1-pHL* en el plásmido pcDNA3.

7.2. Caracterización funcional de los receptores quiméricos GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP en células HEK293.

Para la caracterización funcional de los receptores quiméricos GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP, se realizaron registros electrofisiológicos en células HEK 293 mediante la técnica de *patch clamp*, en la configuración de célula completa. La línea celular HEK293 se ha utilizado ampliamente como un sistema de expresión heteróloga, debido a que su maquinaria celular permite generar proteínas maduras y funcionales, y a otros atributos como la rápida reproducción y el fácil mantenimiento de estas para llevar a cabo experimentos biofísicos. (Thomas P y Smart TG, 2005).

Las células HEK293 transfectadas con la quimera GABA ρ 1-pHL, ó transducidas con el vector viral que codifica para el receptor quimérico GABA ρ 2GFP previamente construido (Martínez-Delgado et al., 2011), se colocaron en una cámara de registro inmersas en *solución extracelular* (NaCl 150 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, Glucosa 10 mM, pH= 7.4), y fueron registradas con una micropipeta de borosilicato, la cual contiene *solución intracelular* (KCl 130 mM, CaCl₂ 0.5 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM, Mg-ATP 3 mM, Mg-GTP 0.4 mM, pH= 7.2). La activación de los receptores quiméricos se llevó a cabo mediante la aplicación de GABA.

7.3. Inmunolocalización de los receptores GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en células STC-1.

Para determinar la distribución de los receptores GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en las células STC-1, fue importante precisar en dónde se encuentran los receptores endógenos en esta línea celular. Para ello, se procedió a realizar ensayos de inmunofluorescencia (Rosas-Arellano, 2012).

Las células fueron lavadas en PBS 1X pH= 7.4 y fijadas en 4% de paraformaldehído, metanol frío y acetona. Posteriormente, se dejó incubando durante 30 minutos con el *suero de bloqueo* (PBS 1X pH= 7.4, Tween 20 al 0.05%, Tritón al 0.1%, suero de burro al 2%). Transcurrido ese tiempo, se incubó con el anticuerpo primario anti- ρ 1 o anti- ρ 2 (cabra, 1:200, Santa Cruz Biotechnology®) a 4° C durante toda la noche. Después, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo, Alexa 594 (burro anti-cabra, 1:200, Molecular Probes®) a 4° C durante toda la noche.

Después de retirar el anticuerpo, se añadió la *solución de lavado* (PBS 1X pH= 7.4, Tween 20 al 0.5%). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal (Zeiss LSM 510 META) con la finalidad de determinar la distribución de los receptores.

7.4. Determinación de la distribución de los receptores quiméricos GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP en células STC-1.

Con la finalidad de observar la distribución de las partículas fluorescentes del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL, se transfectó la línea celular STC-1 a una densidad celular correspondiente a 100,000 células, en cajas Petri con fondo de vidrio de 35 mm (FluoroDish® FD35-100), con poli-L-Lisina (100 μ L), utilizando 5 μ g/ μ L del DNA plasmídico, mezclándolo con 12 μ L de lípidos catiónicos (Lipofectamine 2000®, Invitrogen), diluidos en medio no suplementado (DMEM, GIBCO®). Después, fueron

incubadas a 37° C, bajo condiciones de 5% CO₂, y 95% O₂ durante 4 hrs, para después, reemplazar con medio completo (DMEM + Suero Fetal Bovino al 10%, GIBCO®).

Para la expresión del receptor GABA_ρ2GFP, se siguieron las mismas condiciones de mantenimiento de las células. Fueron transducidas con 2 μL del (1.93 x 10¹¹ pfu/mL) en medio completo (DMEM + Suero Fetal Bovino al 10%, GIBCO®). Posteriormente, fueron incubadas a 37° C, bajo condiciones de 5% CO₂, y 95% O₂.

Las células transfectadas ó transducidas se analizaron a las 24 h y 48 h por microscopía de epifluorescencia (Olympus® BX60), donde se observó la morfología celular y la expresión de la fluorescencia. Mediante microscopía confocal (Zeiss® LSM 510 META), se observaron las células transfectadas con la quimera GABA_ρ1-pHL. A las células se les reemplazó el medio suplementado por una solución Ringer (NaCl 119 mM, KCl 2.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, Glucosa 30 mM, HEPES 25 mM) a pH= 7.4 (Miesenböck et al., 1998). Para incrementar la fluorescencia de GABA_ρ1-pHL que se encuentra intracelular, se añadió en el medio NH₄Cl 50 mM.

La observación de las células que expresa el receptor quimérico GABA_ρ2GFP se les reemplazó el medio suplementado por una solución Ringer o con PBS 1X a pH= 7.4, como está descrito en el trabajo de Martínez-Delgado y colaboradores en el 2011. La obtención de las imágenes a diferentes planos se llevó a cabo utilizando un objetivo 40X/NA 1.35, inmersión en aceite, incidiendo con un láser a una longitud de onda de 488 nm de excitación para activar la GFP ó pHL. Las imágenes fueron analizadas y procesadas con el software *ImageJ*.

8. RESULTADOS

8.1. Construcción del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL.

La primera parte de la estrategia de clonación consistió en la liberación de los fragmentos de ADN que portan la información de GABA ρ 1 y de la pHL, como se observa en la *Figura 10A y B*, ambos fragmentos fueron obtenidos, según lo planteado en *Materiales y Métodos*.

En el panel A se observa el fragmento pHL (carril 1), liberado del plásmido pGEMT.Easy que lo contenía (carril 2). El carril 3 es el fragmento aislado GABA ρ 1 que se obtuvo del plásmido pDG1- ρ 1 (carril 4). En el panel B se muestra el producto de la PCR de una talla esperada de 2.1 Kb, obtenido después de la ligación de los fragmentos de GABA ρ 1 y de la pHL.

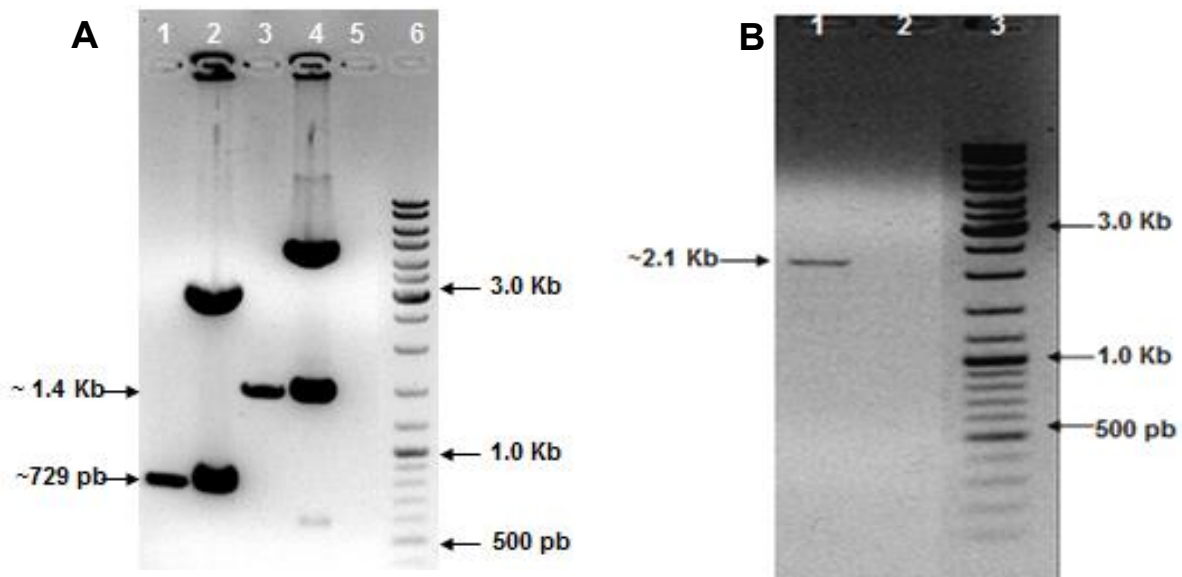


Figura 10. Construcción del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL. A) Análisis de restricción enzimática y purificación de los fragmentos de GABA ρ 1 y pHL. Carril 1, pHL purificado; carril 2, pHL obtenido por el corte enzimático de *Not I* y *Xho I*; carril 3, GABA ρ 1 purificado; carril 4, GABA ρ 1 obtenido por el corte enzimático de *Bam HI* y *Not I*; carril 5, control negativo; carril 6, marcador de peso molecular. B) Amplificación por PCR de la ligación de GABA ρ 1 y pHL. Carril 1, producto de amplificación de una talla esperada de 2.1 Kb; carril 2, control negativo; carril 3, marcador de peso molecular.

Con el fin de facilitar la clonación del fragmento obtenido por la PCR, se ligó este con el plásmido pGEMT.Easy (Figura 11). El panel A muestra el corte del plásmido pGEMT.Easy-GABAp1-pHL con la enzima de restricción *Nco I*. En el panel B muestra el mapa de este plásmido donde se señala los sitios de corte de la enzima *Nco I*.

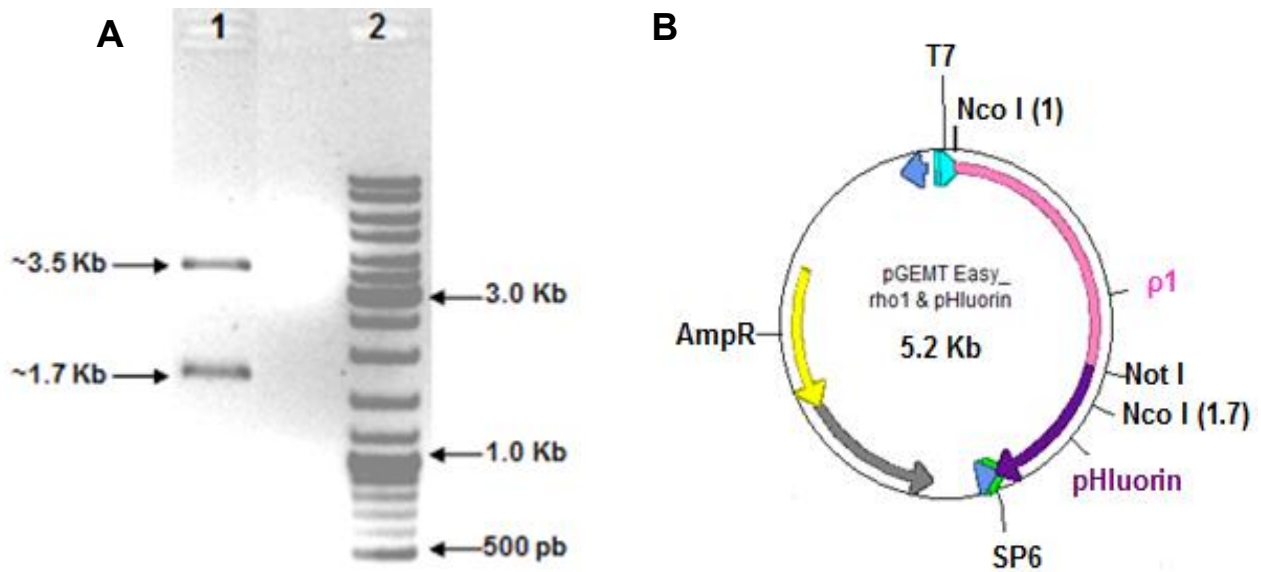


Figura 11. Caracterización enzimática del plásmido pGEMT.Easy-GABAp1-pHL con la enzima *Nco I*. A) Gel de agarosa donde se observa el patrón de restricción. Carril 1, fragmento de ~3.5 Kb, y otro de ~1.7 Kb; carril 2, marcador de peso molecular. B) Mapa del plásmido pGEMT.Easy-GABAp1-pHL.

Para mostrar que al generarse la quimera GABAp1-pHL no se introdujeron errores en la secuencia nucleotídica, se determinó ésta por secuenciación automatizada. La Figura 12 muestra solamente la región de la fusión, en donde la parte subrayada en color negro, indica la incorporación del sitio de reconocimiento para la enzima *Not I*, tanto en el extremo 3' del gen que codifica para GABAp1, como en el extremo 5' del gen que codifica para la pHL.

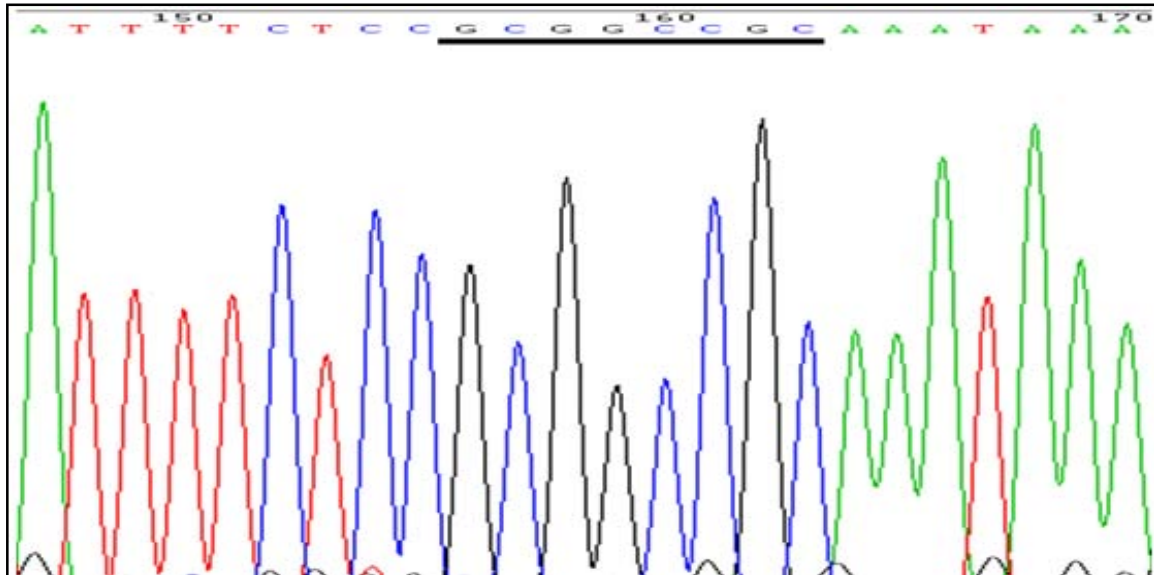


Figura 12. Caracterización por secuenciación del plásmido pGEMT.Easy-GABAp1-pHL. El sitio subrayado en color negro, muestra el sitio de reconocimiento para la enzima *Not I*.

Después de corroborar la secuencia, se clonó el fragmento GABAp1-pHL en el plásmido de expresión pcDNA3. En la *Figura 13*, se muestran los cortes de pcDNA3-GABAp1-pHL con las enzimas *BamHI*, *XhoI* y *BglII*, respectivamente.

En el panel A se observa el patrón de restricción generado con las enzimas *BamHI* y *XhoI*, liberando el fragmento GABAp1-pHL, que corresponde a la banda de ~2.1 Kb, y otro fragmento de mayor tamaño que corresponde al plásmido pcDNA3 (~5.4 Kb). El panel B corresponde al patrón de corte por la enzima *BglII*, donde se observan 2 fragmentos: una banda de ~6.1 Kb, y otra banda de ~1.4 Kb. El panel C muestra el mapa de este plásmido y los sitios de corte por las enzimas *BamHI*, *XhoI* y *BglII*.

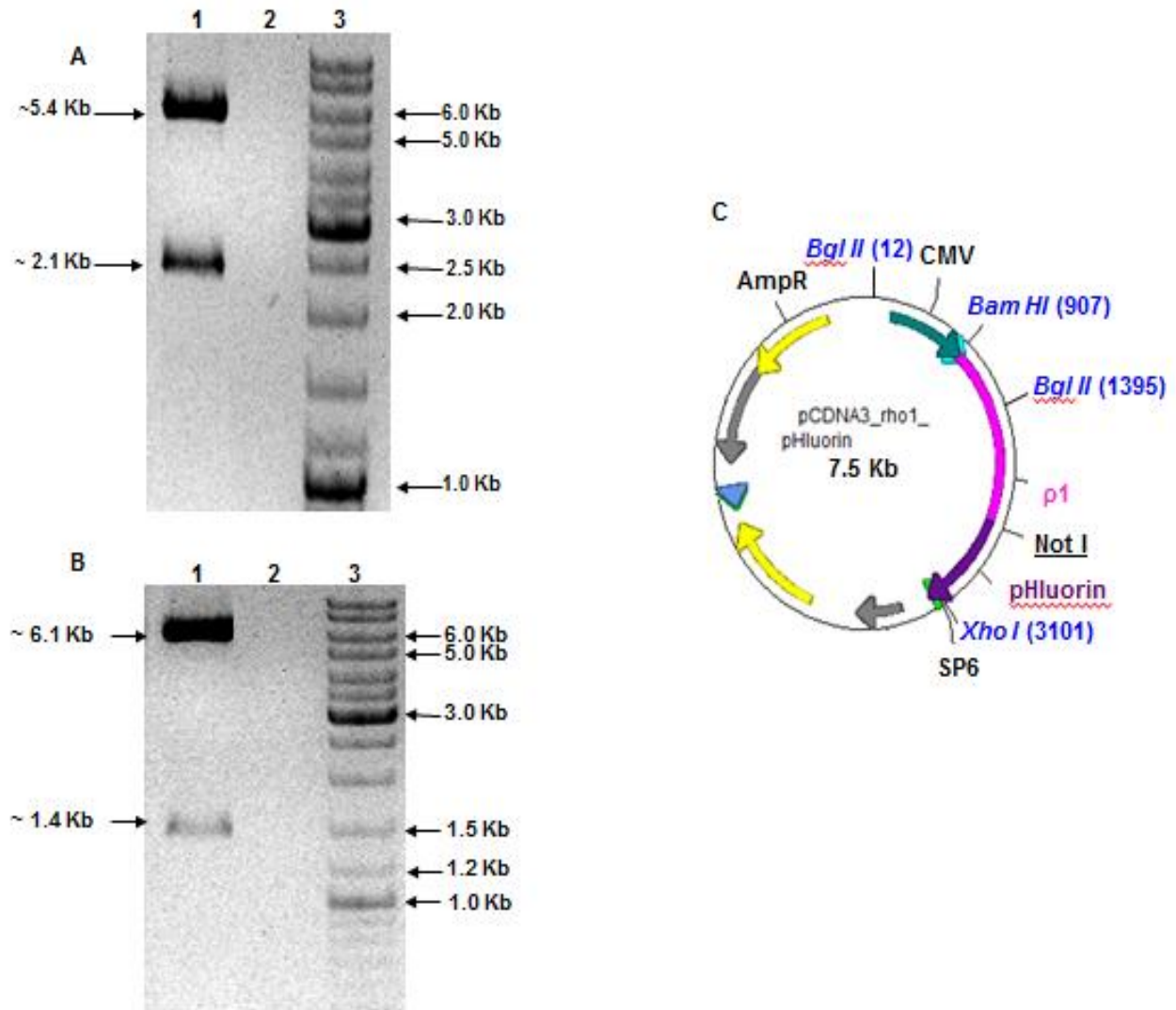


Figura 13. Caracterización del patrón de restricción del plásmido pcDNA3-GABAp1-pHL. A) Gel de agarosa donde se los fragmentos de ADN al digerir el plásmido con las enzimas *Bam HI* y *Xho I*. B) Fragmentos obtenidos al digerir el plásmido con la enzima *Bgl II*. C) Mapa del plásmido donde se identifican los sitios de reconocimiento de las enzimas *Bam HI*, *Xho I* y *Bgl II*.

8.2. Expresión del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL en células HEK293.

Para verificar si el receptor quimérico GABA ρ 1-pHL puede expresarse en células de mamífero, se procedió a transfectar a las células HEK293 con el plásmido en presencia de lípidos catiónicos. La *Figura 14* muestra las células HEK293 transfectadas con los plásmidos GABA ρ 1-pHL, GABA ρ 1-GFP y GFP, observadas por microscopía de epifluorescencia, 22 h post-transfección. La fluorescencia emitida por GABA ρ 1-pHL se encuentra distribuida en diferentes regiones de la célula, en pequeños cúmulos lo que contrasta con la distribución homogénea de la fluorescencia emitida por la GFP. GABA ρ 1-GFP se observó en compartimentos intracelulares. Se observó que la fluorescencia emitida por la GFP es más intensa que aquella detectada en las células que expresaron GABA ρ 1-pHL ó GABA ρ 1-GFP.

Cabe señalar que la eficiencia de transfección fue diferente para cada plásmido desde un 80% para GFP, 60% para GABA ρ 1-GFP y 30% para GABA ρ 1-pHL. Por otro lado, se observó a las 48h post-transfección de GABA ρ 1-pHL, las células cambiaron su morfología, observándose redondeadas y muchas de ellas flotando, similar a las observaciones previas donde se transfectó GABA ρ 1-GFP en células HEK293 (Martínez-Torres y Miledi, 2001); en contraste con las células transfectadas con GFP donde no se observaron estas alteraciones.

Con la finalidad de observar las partículas fluorescentes antes de que se afectara la morfología celular, se tomaron imágenes por microscopía confocal a las 16 h post-transfección, añadiendo al medio NH₄Cl 50 mM para evidenciar la fluorescencia de la pHL. La *Figura 15* muestra las células HEK293 transfectadas con GABA ρ 1-pHL y con GABA ρ 1-GFP. Se puede apreciar la distribución punteada en la célula transfectada con GABA ρ 1-pHL, en comparación con la distribución compartimentalizada de GABA ρ 1-GFP.

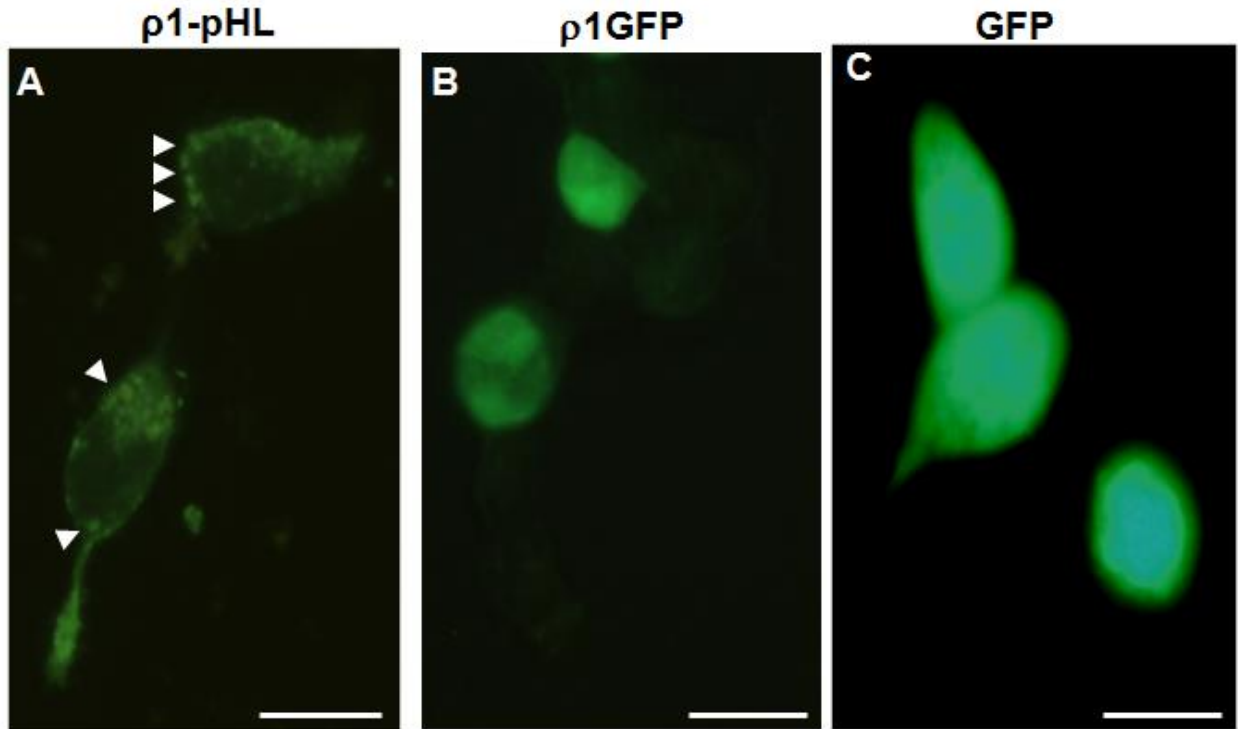


Figura 14. Distribución del receptor quimérico GABAp1-pHL en células HEK293 22 h postransfección. Las cabezas de flecha muestran las vesículas fluorescentes en la periferia de la célula. A) GABAp1-pHL, B) GABAp1-GFP, C) GFP. Barra = 20 μ m.

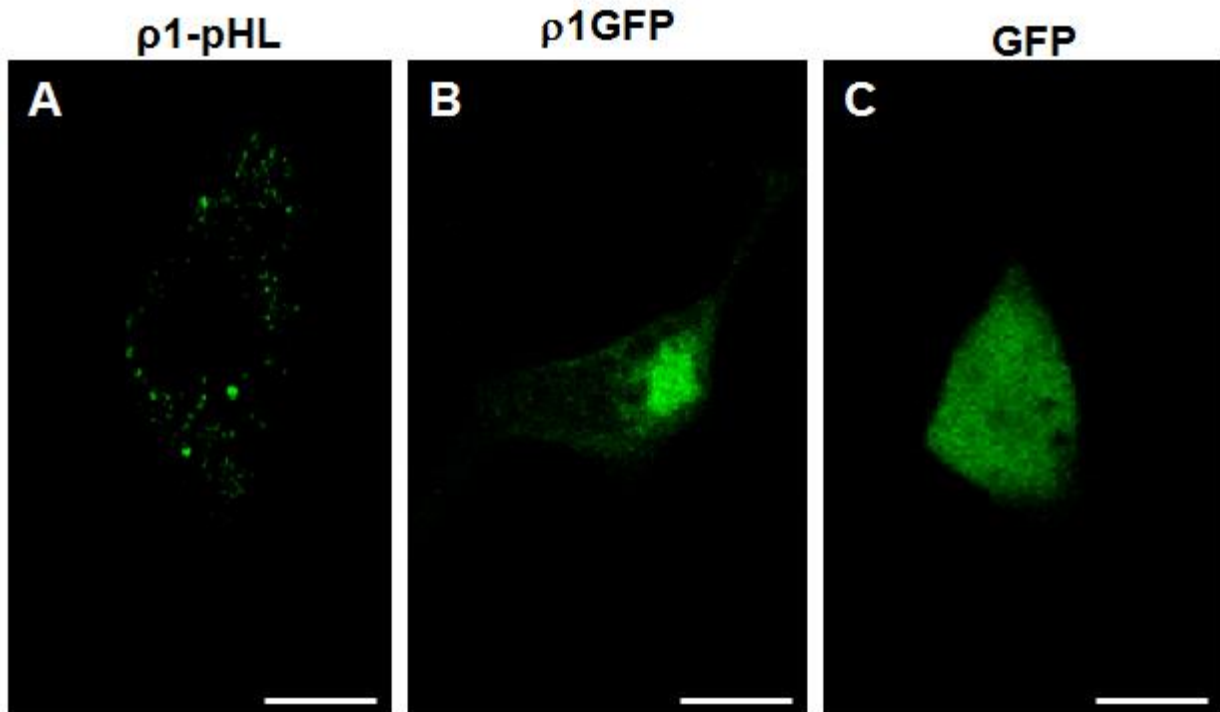


Figura 15. Distribución del receptor quimérico GABAp1-pHL en células HEK293 16 h postransfección con NH₄Cl en el medio. A) GABAp1-pHL, B) GABAp1-GFP, C) GFP. Barra = 10 μ m.

8.3. Inmunolocalización de los receptores GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en células STC-1.

Para los objetivos planteados fue necesario determinar en qué región de la membrana plasmática de las células STC-1 se encuentra el receptor endógeno, por lo que se ubicó su posición mediante inmunofluorescencia.

La *Figura 16* muestra la localización de GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en células permeabilizadas. En ambas imágenes obtenidas por microscopía confocal, se observan diferencias en la localización de ambos receptores. En el caso del receptor GABA ρ 1, muestra una distribución homogénea en toda la célula, en comparación con la fluorescencia tenue distribuida en el contorno de la célula del receptor GABA ρ 2.

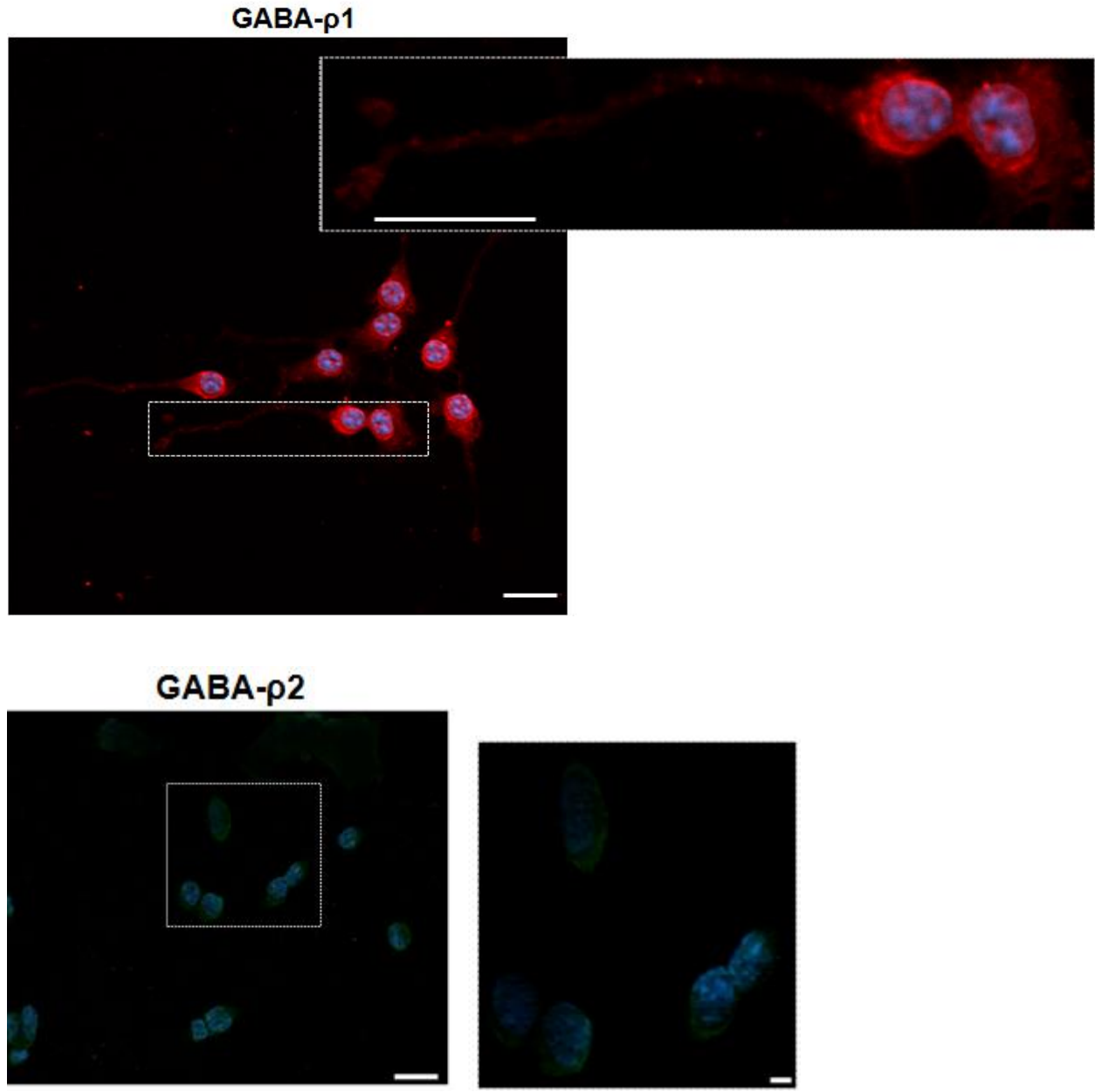


Figura 16. Inmunolocalización del receptor GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en células STC-1 permeabilizadas. La imagen superior corresponde a la distribución del receptor GABA ρ 1 en toda la célula. La imagen inferior muestra la distribución receptor GABA ρ 2, localizándose solo en el soma. Barra= 20 μ m.

8.4. Expresión de los receptores quiméricos GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP en células STC-1.

En comparación con las células HEK293, las células STC-1 son transfectadas con menor eficiencia. En varios ensayos donde se utilizó el plásmido con la GFP se obtuvieron eficiencias no mayores al 30%. La *Figura 17* muestra que la eficiencia de transfección es muy baja y la fluorescencia observada en las células transfectadas con GABA ρ 1-pHL no es muy intensa. El seguimiento en la expresión de GABA ρ 1-pHL se llevó a cabo a las 24, 48, 36 y 72 h post-transfección, sin observar cambios en todos estos tiempos.

Una vez determinada la expresión del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL, la siguiente parte consistió en observar la expresión del receptor quimérico GABA ρ 2GFP en la línea celular STC-1 a través de la transducción del AdvGABA ρ 2GFP, tal como se observa en la *Figura 18*, donde se muestra la distribución de la fluorescencia del receptor quimérico, en contraste con un marcador de membrana plasmática lipofílico, FM4-64.

Por otro lado, se procedió a dar seguimiento temporal a la expresión del receptor quimérico GABA ρ 2GFP. En la *Figura 19*, se observa que a partir de las 8 h aparecen cúmulos fluorescentes, manteniendo esta condición a las 16 h. Este patrón es similar a lo observado en los astrocitos de cerebelo (Martínez-Delgado et al., 2011). A las 24 h, esta distribución se pierde para dar paso a una distribución homogénea en el citosol.

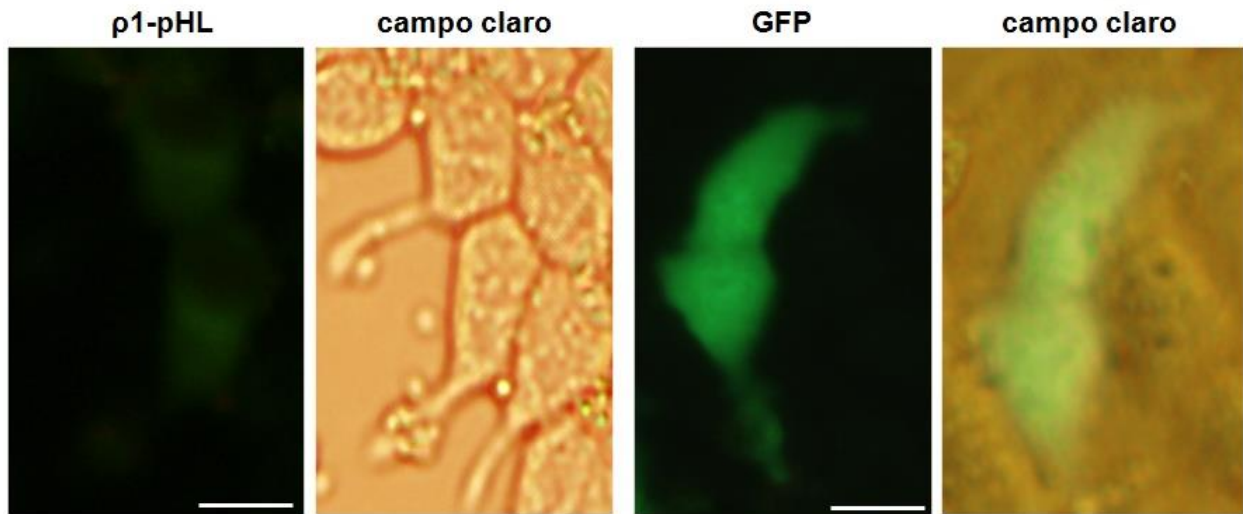


Figura 17. Distribución del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL en células STC-1 24 h postransfección en comparación con la fluorescencia emitida por GFP. Barra = 20 μ m

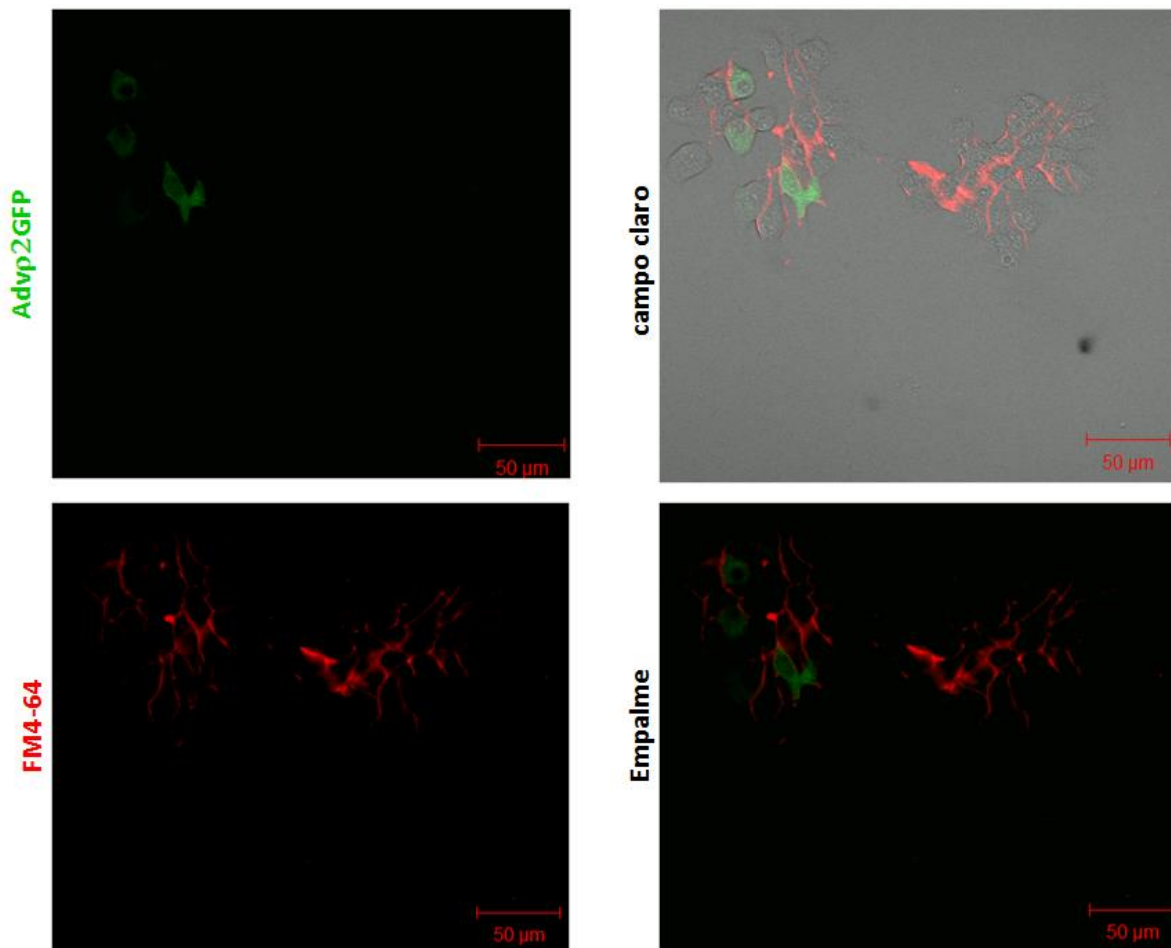


Figura 18. Expresión del receptor quimérico GABA ρ 2GFP en células STC-1 8 h postransfección.

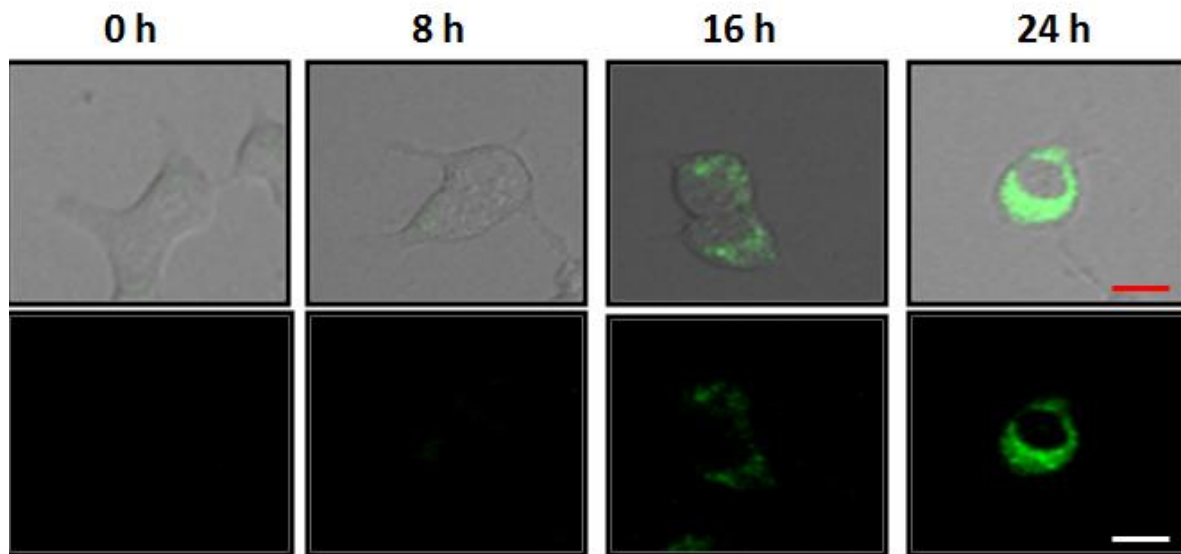


Figura 19. Curso temporal de la expresión del receptor quimérico GABA ρ 2GFP en células STC-1 (n=3; N=5). Barra = 20 μ m

8.5. Expresión funcional de GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP en células HEK293.

Una vez determinada la localización de las proteínas quiméricas, se procedió a iniciar su caracterización funcional. Para ello, se transfectaron células HEK293 con la quimera GABA ρ 1-pHL y 24 h después se realizaron registros electrofisiológicos con la técnica de patch clamp en configuración de célula completa en presencia de GABA a 100 μ M. Como se observa en la *Figura 20* al estimular las células con el agonista se generó una corriente de alrededor de 1.5 nA. Sin embargo, debido a las alteraciones en la membrana plasmática, así como a la baja eficiencia de transfección, no se encontró consistencia en las corrientes generadas por este receptor. Esto sugiere que la expresión de esta quimera induce cambios en estas células. Por otra parte, los registros realizados para determinar la funcionalidad del receptor quimérico GABA ρ 2GFP indicaron que este genera corrientes, a 100 μ M de GABA, de alrededor de 100 pA, que no desensibilizan, tal como el receptor silvestre (López-Chavez et al., 2005).

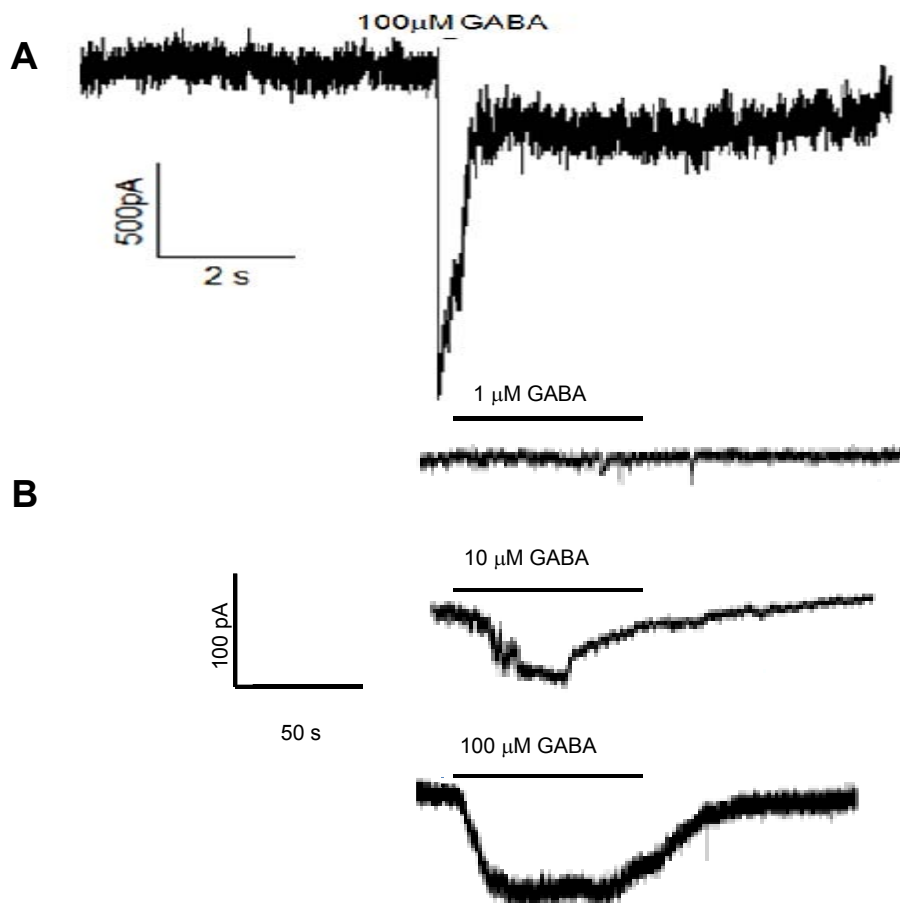


Figura 20. Caracterización funcional de la quimera GABA ρ 1-pHL (A) y de GABA ρ 2GFP (B) en células HEK293.

9. DISCUSIÓN

La finalidad de este trabajo fue la de generar receptores quiméricos fusionados a proteínas fluorescentes que nos permitan observar la dinámica del receptor GABA ρ en un sistema *in vivo*.

Desarrollamos la quimera GABA ρ 1-pHL la cual se logró expresar en las líneas celulares HEK293 y STC-1. Sin embargo, la expresión y la intensidad de la fluorescencia no fue la adecuada para llevar a cabo el seguimiento y distribución de las partículas fluorescentes además de los cambios morfológicos que se generan en las células HEK293, y que son similares a previos reportes donde se transfectó GABA ρ 1GFP (Martínez-Torres et al., 2001). De igual manera, estas alteraciones afectaron la funcionalidad del receptor quimérico posiblemente debido a modificaciones en la membrana plasmática.

La pertinencia de emplear la proteína pHL en estudios de tráfico intracelular de receptores ha sido ampliamente abordada. Por ejemplo, los receptores AMPA acoplados a la pHL han sido fundamentales para entender los mecanismos de su endocitosis y direccionamiento y de su difusión lateral (Ashby et al., 2004). En ésta, la morfología de las espinas dendríticas de las neuronas del hipocampo influyen en la velocidad y en el número de receptores de AMPA, modificando así la función sináptica (Ashby et al., 2006). Sin embargo, la regulación de la difusión lateral no ha sido elucidada.

El uso de fármacos puede modificar el tráfico intracelular de los receptores, como es el caso de la morfina. Existen reportes donde la exposición crónica a este fármaco induce internalización de los receptores de AMPA en el hipocampo. Incorporando la pHL en el amino terminal del receptor AMPA, GluR1, se observó que la exposición prolongada de morfina induce la internalización de los receptores sinápticos y extrasinápticos en las neuronas del hipocampo (Kam et al., 2010).

El reclutamiento, internalización y tráfico de los receptores de AMPA es afectado por la activación de los receptores de NMDA. Utilizando la pHL fusionada en el amino terminal del receptor AMPA, GluR2, reportaron que estos receptores sinápticos y extrasinápticos responden de manera distinta a la activación de los receptores de NMDA, ocasionando

una internalización rápida a aquellos receptores extrasinápticos y una lenta remoción de los receptores sinápticos (Ashby, et al., 2004; Yang et al., 2006).

Sin embargo, la activación tanto de receptores de AMPA como de NMDA por sus agonistas puede influir en el pH intracelular y afectar la dinámica de los receptores. Trabajos recientes donde utilizaron la pHL fusionada al amino terminal del receptor GluA2, mostraron que la fluorescencia emitida es afectada debido a la activación de los receptores NMDA, influyendo en el pH intracelular, tanto en el soma, como en las dendritas de las neuronas del hipocampo (Rathje et al., 2013).

Otro trabajo en donde se emplea la pHL fue realizado por Baines y colaboradores (2011), donde incorporaron la secuencia señal de la hormona del crecimiento en los receptores de adenosina fusionados a la pHL para elucidar su tráfico intracelular y procesos de internalización diferencial de estos receptores en neuronas de hipocampo.

Aun cuando los estudios mencionados anteriormente muestran la utilidad de la pHL en estudios de tráfico intracelular, en nuestro estudio su empleo es limitado debido al nivel de fluorescencia producido por la construcción. Esto se atribuye a la limitada sensibilidad de la proteína fluorescente pHL y a la autofluorescencia generada por la membrana celular, por lo que, para observar su fluorescencia, se deben esperar largos períodos de expresión (Dreosti y Lagnado et al., 2009). Otra posibilidad para explicar el bajo nivel de fluorescencia sería que hubo un nivel bajo de expresión del receptor quimérico o que la proteína es muy susceptible de ser degradada. Para mostrar o descartar esta posibilidad, se podría recurrir a ensayos de Western blot.

Por otra parte, la caracterización electrofisiológica del receptor mostró que GABA_p1-pHL genera una corriente característica de los receptores GABA_p: en presencia del agonista, se muestra una rápida activación y una lenta desensibilización una vez que se retira el agonista (*Figura 20*). Sin embargo, los registros no fueron consistentes debido a los cambios morfológicos inducidos en las células después de la transfección y que modificaron las propiedades de la membrana plasmática.

Para el caso del receptor quimérico GABA ρ 2-GFP, la situación es distinta. La expresión del receptor se observó a partir de las 8 h de transducción y la intensidad de la fluorescencia es más evidente en comparación con GABA ρ 1-pHL. La distribución de la fluorescencia en las células STC-1, así como el tamaño de las partículas fluorescentes corresponden al tamaño reportado en astrocitos de cerebelo (Martínez-Delgado et al., 2011). Además, la funcionalidad del receptor quimérico GABA ρ 2-GFP es consistente con la de los receptores GABA ρ (Alakuijala et al., 2005; López-Chávez et al., 2005; Martínez-Delgado et al., 2011), como se pudo comprobar a través de los registros obtenidos por patch-clamp (*Figura 20*).

Los receptores quiméricos construidos y caracterizados en este trabajo permitirán ahondar sobre el tráfico intracelular de los receptores a GABA.

10. CONCLUSIONES

1. Se generó la quimera GABA ρ 1-pHL
2. La expresión de GABA ρ 1-pHL indujo cambios en las células HEK293 que impidieron obtener registros electrofisiológicos consistentes.
3. GABA ρ 2-GFP expresada en HEK293 generó corrientes similares al receptor silvestre.

11. PERSPECTIVAS

En experimentos futuros, se tiene contemplado utilizar estos receptores quiméricos de GABA ρ para el seguimiento, distribución y dinámica del receptor en las neuronas bipolares que se encuentran en la retina donde fueron inicialmente descritos.

12. REFERENCIAS

1. Akinci MK, Schofield PR. 1999. Widespread expression of GABAA receptor subunits in peripheral tissues. *Neurosci. Res.* 35(2):145-153
2. Alakuijala A, TalviOja K, Pasternack A, Pasternack M. 2005. Functional characterization of rat rho2 subunits expressed in HEK293 cells. *Eur. J. Neurosci.* 21:692-700.
3. Arancibia-Cárcamo IL, Kittler JT. 2009. Regulation of GABAA receptor membrane trafficking and synaptic localization. *Pharmacol. Ther.* 123(1):17-31.
4. Ashby MC, De La Rue SA, Uney G, Collingridge GL, Henley J. 2004. Removal of AMPA receptors (AMPA receptors) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs. *J. Neurosci.* 24(22):5172-6.
5. Ashby MC, Maier SR, Nishimune A, Henley J. 2006. Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *J Neurosci.* 26(26):7046-55.
6. Bailey M, Albrecht BE, Johnson KJ. 1999. Genetic linkage and radiation hybrid mapping of the three human GABA ρ receptor ρ subunit genes: GABRR1, GABRR2 and GABRR3. *Biochim. Biophys. Acta Gene. Struct. Expr.* 1447:307-312.
7. Baines AE, Corrêa SAL, Irving AJ, Frenguelli BG. 2011. Differential trafficking of adenosine receptors in hippocampal neurons monitored using GFP- and super-ecliptic pHluorin-tagged receptors. *Neuropharmacology* 61(1-2):1-11.

8. Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of GABA during development: the nature of nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3(9):728-739.
9. Billups D, Hanley JG, Orme M, Attwell D, Moss SJ. 2000. GABA_A receptor sensitivity is modulated by interaction with MAP1B. *J. Neurosci.* 20(23):8643-8650.
10. Bormann J. 1988. Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptors subtypes. *Trends Neurosci.* 11:112-116.
11. Bormann J. 2000. The ABC of GABA receptors. *TIPS.* 21:16-19.
12. Bormann J, Feigenspan A. 2001 GABA_A receptors: structure, function and pharmacology. *Pharmacology of GABA and Glycine Neurotransmission* (Möhler, H., ed.) Springer-Verlag.
13. Chalfie M. 1995. Green Fluorescent Protein. *Photochemistry & Photobiology* 62(4): 651-656.
14. Chebib M, Johnston, GA. 2000. GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J. Med. Chem.* 43:1427-1447.
15. Chebib M. 2004. GABA_A receptor ion channels. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31:800-804.
16. Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA. 2005. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *TRENDS Biotech.* 23(12):605-613.

17. Cutting GR, Curristin S, Zoghbi H, O'Hara B, Seldin MF, Uhl GR. 1992. Identification of a putative gamma-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(4):801-6.
18. Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kash LM, Rafizadeh-Montrose C, Donovan DM, Shimada S, Antonarakis SE, Guggino WB, Uhl GR, Kazazian Jr. HH. 1991. Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2673-2677.
19. Dreosti E, Odermatt B, Dorostkar MM, Lagnado L. 2009. A genetically encoded reporter of synaptic activity in vivo. *Nat. Methods* 6(12):883-9.
20. Enz R. 2001. GABA_A receptors: A molecular view. *Biol. Chem.* 382:1111-1122.
21. Enz R, Cutting GR. 1999. GABA_A receptor ρ subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur. J. Neurosci.* 11(1):41-50.
22. Estrada-Mondragon A, Reyes-Ruiz JM, Martínez-Torres A, Miledi R. 2010. Structure-function study of the fourth transmembrane segment of the GABA rho1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107(41):17780-17784.
23. Feigenspan A, Bormann J. 1994. Differential pharmacology of GABA_A and GABA_C receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur. J. Pharmacol.* 288, 97-104.
24. Feigenspan A, Bormann J. 1998. GABA-gated Cl⁻ channels in the rat retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 17:99-126.

25. Feigenspan A, Wässle H, Bormann J. 1993. Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. *Nature* 361:159-162.
26. Filippova N, Dudley R, Weiss D. 1999. Evidence for phosphorylation-dependent internalization of recombinant human rho1 GABA_c receptors. *J. Physiol.* 518(2):385-399.
27. Fletcher EL, Koulen P, Wässle H. 1998. GABA_A and GABA_c receptors on mammalian rod bipolar cells. *J. Comp. Neurol.* 396(3):351-365.
28. Gallagher MJ, Shen W, Song L, Macdonald RL. 2005. Endoplasmic reticulum retention and associated degradation of a GABA_A receptor epilepsy mutation that inserts an aspartate in the M3 transmembrane segment of the alpha 1 subunit. *J. Biol. Chem.* 280(45):37995-38004.
29. Gerdes HH, Kaether C. 1996. Green Fluorescent Protein: Applications in cell biology. *FEBS Letters* 389:44-47.
30. Glassmeier G, Herzig KH, Höpfner M, Lemmer K, Jansen A, Scherubl H. 1998. Expression of functional GABA_A receptors in cholecystinin-secreting gut neuroendocrine murine STC-1 cells. *J. Physiol.* 510 (Pt 3):805-814.
31. Hanley JG, Koulen P, Bedford F, Gordon-Weeks PR, Moss SJ. 1999. The protein MAP-1B links GABA_c receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature* 397:66-69.
32. Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GAR. 2006. Mixed antagonistic effects of bilobalide at rho1 GABA_c receptor. *Neurosci.* 137:607-617.
33. Iversen LL, Iversen SD, Bloom FE, Roth RH. 2009. Introduction to Neuropsychopharmacology. Estados Unidos. Oxford University Press.

34. Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, Saliba RS, Kittler JT, Haydon PG, Moss SJ. 2005. Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABA_A receptors. *J. Neurosci.* 25(45):10469–10478.
35. Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. 2008. GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.* 9(5):331-343.
36. Jansen A, Hoepfner M, Herzig K-H, Riecken E-O, Scherübl H. 2000. GABA_C receptors in neuroendocrine gut cells: a new GABA-binding site in the gut. *Eur. J. Physiol.* 441:294-300.
37. Kam AY, Liao D, Loh HH, Law PY. 2010. Morphine induces AMPA receptor internalization in primary hippocampal neurons via calcineurin-dependent dephosphorylation of GluR1 subunits. *J. Neurosci.* 30(45):15304-16.
38. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. Principles of neural science. 4th Edition. McGraw-Hill Medical.
39. Kang JQ, Shen W, Macdonald RL. 2006. Why does fever trigger febrile seizures? GABA_A receptor gamma 2 subunit mutations associated with idiopathic generalized epilepsies have temperature-dependent trafficking deficiencies. *J. Neurosci.* 26(9):2590-2597.
40. Kneen M, Farinas J, Li Y, Verkman AS. 1998. Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys. J.* 74:1591-1599.
41. Lévi S, Logan SM, Tovar KR, Craig AM. 2004. Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 24(1):207-217.

42. Li S, Zhang Y, Liu H, Yan Y, Li Y. 2008. Identification and expression of GABA_C receptor in rat testis and spermatozoa. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40(8):761-767.
43. López-Chávez A, Miledi R, Martínez-Torres A. 2005. Cloning and functional expression of the bovine GABA_C rho2 subunit. Molecular evidence of a widespread distribution in the CNS. *Neuroscience Research.* 53:421-427.
44. Lukasiewicz PD, Eggers ED, Sagdullaev BT, McCall MA. 2004. GABA_C receptor-mediated inhibition in the retina. *Vision Res.* 44(28):3289-3296.
45. Lukasiewicz PD, Maple BR, Werblin FS. 1994. A novel GABA receptor on bipolar cells terminals in the tiger salamander retina. *J. Neurosci.* 14:1202-1212.
46. Macdonald RL, Kang JQ, Gallagher MJ. 2010. Mutations in GABA_A receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J. Physiol.* 588(11):1861-1869.
47. Macdonald RL, Olsen RW. 1994. GABA_A receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:569-602.
48. Martin DL, Olsen RW. 2000. *GABA in the Nervous System: The View at Fifty Years.* Philadelphia, PA. Lippincott, Williams & Wilkins.
49. Martínez-Delgado G, Estrada-Mondragón A, Miledi R, Martínez-Torres A. 2010. An update of GABA rho receptors. *Curr. Neuropharm.* 8:422-433.
50. Martínez-Delgado G, Reyes-Haro D, Espino-Saldaña AE, Rosas-Arellano A, Pétriz A, Juárez-Mercado P, Miledi R, Martínez-Torres A. 2011. Dynamics of GABA_{p2} receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes. *Neuroreport* 22(11):4-9.

51. Martínez-Torres A, Miledi R, 2001. Expression of gamma-aminobutyric acid rho1 and rho1delta450 as gene fusions with the green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:1947-1951.
52. McCall MA, Lukasiewicz PD, Gregg RG, Peachey NS. 2002. Elimination of the rho1 subunit abolishes GABA_C receptor expression and alters visual processing in the mouse retina. *J. Neurosci.* 22:4163-4174.
53. McGillem GS, Rotolo TC, Dacheux RF. 2000. GABA responses of rod bipolar cells in rabbit retinal slices. *Vis. Neurosci.* 17:381-389.
54. Meixner A, Haverkamp S, Wässle H, Führer S, Thalhammer J, Kropf N, Bittner RE, Lassmann H, Wiche G, Propst F. 2000. MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* 151(6):1169-1178.
55. Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. 1998. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature.* 394:192-195.
56. Miller PS, Aricescu AR. 2014. Crystal structure of human GABA_A receptor. *Nature.* 513:1-18
57. Mohrlüder J, Schwarten M, Willbold D. 2009. Structure and potential function of γ -aminobutyrate type A receptor-associated protein. *FEBS Journal* 276:4989-5005.
58. Murata Y. 1996. The first selective antagonist for a GABA_C receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6:2073-2076.
59. Ogurusu T, Shingai R. 1996. Cloning of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit ρ 3 cDNA. *Biochim Biophys Acta* 1305:15-18.

60. Ogurusu T, Yanagi K, Watanabe M, Fukaya M, Shingai R. 1999. Localization of GABA receptor rho2 and rho3 subunits in rat brain and functional expression of homooligomeric rho3 receptors and heterooligomeric rho2 rho3 receptors. *Receptors Channels*. 6:463-475.
61. Olkkonen VM, Ikonen E. 2006. When intracellular logistics fails-genetic defects in membrane trafficking. *J. Cell Sci*. 119(24):5031-5045.
62. Olsen RW, Sieghart W. 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma aminobutyric acid A receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology and function. Update. *Pharmacol. Rev.* 60(3):243-260.
63. Olsen RW, Sieghart W. 2009. GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacol.* 56:141-148.
64. Olsen RW, Tobin AJ. 1990. Molecular Biology of GABA_A receptors. *FASEB J.* 4:1469-1480.
65. Pan ZH, Lipton SA. 1995. Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals. *J. Neurosci.* 15:2668-2679.
66. Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. 1991. Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:4318-4332.
67. Qian H, Ripps H. 2009. Focus on molecules: The GABA_C receptor. *Exp. Eye Res.* 88(6):1002-1003.

68. Ragozzino D, Woodward RM, Murata Y, Eusebi F, Overman LE, Miledi R. 1996. Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acid C receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* 50(4):1024-30.
69. Rathje M, Fang H, Bachman JL, Anggono V, Gether U, Huganir, RL, Madsen KL. 2013. AMPA receptor pHluorin-GluA2 reports NMDA receptor-induced intracellular acidification in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(35):14426-14431.
70. Reyes-Haro D, Cabrera-Ruíz E, Estrada-Mondragón A, Miledi R, Martínez-Torres A. 2014. Modulation of GABAA receptors of astrocytes and STC-1 cells by taurine structural analogs. *Amino Acids.* 46(11):2587-2593.
71. Rosas-Arellano A. 2012. Distribución y función de las subunidades GABA(A) ρ en el neocórtex e hipocampo de ratón (*Mus musculus*). Tesis Doctoral. INB-UNAM.
72. Rosas-Arellano A, Ochoa-de la Paz LD, Miledi R, Martínez-Torres A. 2007. Brain distribution and molecular cloning of the bovine GABA rho1 receptor. *Neurosci. Res.* 57(3):347-53.
73. Rozzo A, Armellin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, Tongiorgi E. 2002. Expression and dendritic mRNA localization of GABA ρ receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 15(11):1747-1758.
74. Ruiz A, Borrego S, Marcos I, Antiñolo G. 1998. A major locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on 6q determined by homozygosity mapping of chromosomal regions that contain gamma-aminobutyric acid-receptor clusters. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1452-1459.

75. Sagdullaev BT, McCall MA, Lukasiewicz PD. 2006. Presynaptic inhibition modulates spillover, creating distinct dynamic response ranges of sensory output. *Neuron*. 50(6):923-935.
76. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3ra. Edición. Editorial CSHL Press. 3:15.44-15.48.
77. Sankaranarayanan S, De Angelis D, Rothman JE, Ryan TA. 2000. The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys. J.* 79(4):2199-2208.
78. Shimada S, Cutting G, Uhl GR. 1992. Gamma-aminobutyric acid A or C receptor? gamma-aminobutyric acid rho1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine- insensitive gamma-aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 41(4):683-7.
79. Thomas P, Smart TG. 2005. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 51(3):187-200.
80. Twelvetrees AE, Yuen EY, Arancibia-Carcamo IL, MacAskill AF, Rostaing P, Lumb MJ, Humbert S, Triller A, Saudou F, Yan Z, Kittler JT. 2010. Delivery of GABA_ARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron* 65(1):53-65.
81. Varela C, Blanco R, De la Villa P. 2005. Depolarizing effect of GABA in rod bipolar cells of the mouse retina. *Vis. Res.* 45: 2659-2667.
82. Wang Tian-L, Guggino WB, Cutting GR. 1994. A novel γ -aminobutyric acid receptor subunit rho2 cloned from human retina forms bicuculline-insensitive homooligomeric receptors in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 14:6524-6531.

83. Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. 2002. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int. Rev. Cytol.* 213:1-47.
84. Yang G, Huang A, Zhu S, Xiong W. 2006. It is time to move: role of lateral diffusion in AMPA receptor trafficking. *J. Neurosci.* 26(36):9082-3.
85. Yudowski GA, Puthenveedu MA, Leonoudakis D, Panicker S, Thorn KS, Beattie EC, von Zastrow M. 2007. Real-time imaging of discrete exocytic events mediating surface delivery of AMPA receptors. *J. Neurosci.* 27(41):11112-11121.

Artículo Publicado

Martínez-Delgado G, Reyes-Haro D, Espino-Saldaña AE, Rosas-Arellano A, Pétriz A, **Juárez-Mercado P**, Miledi R, Martínez-Torres A. 2011. Dynamics of GABA_A receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes. *Neuroreport* 22(11):4-9.

13. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo estructural del receptor GABA ρ	4
Figura 2. Corrientes generadas por GABA ρ en ovocitos de <i>X. laevis</i> y en células HEK293.	5
Figura 3. Inmunolocalización del receptor GABA ρ en neuronas bipolares y corrientes generadas por receptores a GABA en neuronas bipolares.	6
Figura 4. Organización celular de la retina de vertebrados y participación del receptor GABA ρ en la modulación de la respuesta glutamatérgica.	7
Figura 5. Aplicaciones de las proteínas fluorescentes en sistemas <i>in vivo</i> .	11
Figura 6. Vía de tráfico de un receptor de membrana acoplado a la proteína fluorescente <i>pHluorin</i> (pHL).	13
Figura 7. Inmunolocalización del receptor GABA ρ 1 en células STC-1 permeabilizadas.	14
Figura 8. Estrategia para la construcción de la fusión GABA ρ 1-pHL.	17
Figura 9. Esquema experimental de la clonación del fragmento GABA ρ 1-pHL en el plásmido pcDNA3.	22
Figura 10. Construcción del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL.	26
Figura 11. Caracterización enzimática del plásmido pGEMT.Easy-GABA ρ 1-pHL con la enzima <i>Nco I</i> .	27
Figura 12. Caracterización por secuenciación del plásmido pGEMT.Easy-GABA ρ 1-pHL.	28

Figura 13. Caracterización del patrón de restricción del plásmido pcDNA3-GABA ρ 1-pHL.	29
Figura 14. Distribución del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL en células HEK293	31
Figura 15. Distribución del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL en células HEK293 (confocal).	31
Figura 16. Inmunolocalización de los receptores GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en células STC-1 permeabilizadas.	33
Figura 17. Distribución del receptor quimérico GABA ρ 1-pHL en células STC-1.	35
Figura 18. Expresión del receptor quimérico GABA ρ 2GFP en células STC-1.	35
Figura 19. Curso temporal de la expresión del receptor quimérico GABA ρ 2GFP en células STC-1.	36
Figura 20. Caracterización funcional de la quimera GABA ρ 1-pHL y GABA ρ 2GFP en células HEK293.	37

14. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación del fragmento GABAp1-pHL.	18
Tabla 2. Condiciones para la reacción de PCR.	19
Tabla 3. Condiciones de amplificación del fragmento de GABAp1-pHL.	19